

脳梗塞モデル動物への運動処方と糖代謝を介する神経可塑性の関係 —ニューロリハと糖代謝の関係—

1. 研究の目的

脳梗塞を含む脳血管障害（脳卒中）は、発症後に後遺症を残し日常生活に支障をきたす代表的な疾患である。運動療法を含むリハビリテーションは発症後の運動障害や高次脳機能障害などからの回復を促すが、どのような機序によるのか、特に神経系の再構築に対してどのような影響を与えるのか、については良く分かっていない。そこで、我々は光増感法による実験的脳梗塞モデル動物作出法を改良して独自に確立した運動皮質梗塞モデル動物を用いて、梗塞巣近傍の神経再構築と運動機能回復との関係とそれらに対する運動負荷の役割について組織学および運動学的に検討している。

神経系は神経（電気）活動による入力情報の変化に伴い、その構造・機能に変化が生じる「神経可塑性」という性質を持つ。この神経可塑性は成体では大部分失われていくと長いこと考えられてきたが、神経科学の進歩から成体の脳にも潜在的な可塑性があり、その能力を顕在化していく重要性が示唆された（Hubener & Bonhoeffer, *Cell*, 2014）。脳の傷害時においても特定の条件下で起こる神経細胞やグリア細胞の新生が脳機能の獲得や傷害後の機能回復と関わる事が分かってきている。そこで、我々も上記モデル動物を用いて神経系の細胞の新生と運動負荷の関係について調べたところ、運動負荷群では後肢の運動機能が回復する事と梗塞巣の近傍に新たに分裂することで生じた神経（幹）細胞やそれに由来する細胞が集積することが見出された。

一方、熊田らは特定パターンを示す神経活動（細胞内 Ca^{2+} 変化で可視化される）がシナプス形成以前においても神経発生（神経新生や神経細胞移動など）のイベントの進行を制御することを見出してきた（Kumada & Komuro, *PNAS*, 2004, Kumada et al, *J. Neurosci*, 2006, Komuro, Kumada et al, *Comp Dev Neurosci*, 2013）。この神経活動には NMDA 受容体や GABA_A 受容体の活性化などの神経伝達物質とその受容体が関与する（小室・熊田 *臨床神経学* 2005, Wang, Kumada et al, *Cereb Cortex*, 2014）。そこで、我々は運動に伴う神経活動が傷害後に起こる神経新生を伴う再生過程を促す可能性に着目しているが、成体の組織培養系が困難なため、両者の直接的な関係を求めるのは難しい。

糖代謝産物の乳酸は運動時に濃度上昇し疲労に関わる物質として広く知られる。最近、乳酸は NMDA 受容体を介する神経の電気活動に影響を与え可塑性の制御に関わる事が報告された（Suzuki et al, *Cell*, 2011, Yang et al, *PNAS* 2014）。そこで、我々は「乳酸などの運動による糖代謝産物が神経幹細胞の産生や神経再編成に影響を及ぼすメディエーターとして働き、神経伝達物質受容体活性化に起因する神経活動のパターンに影響を与える」という仮説を立てた。

本研究では、第一歩としてリハビリテーション、栄養科学の専門家と共に、運動負荷の介入法（タイミングや強度など）とグリコーゲンや乳酸などの糖代謝産物、神経新生を中心とした神経系の再構築、運動機能の回復の関係性について明らかにしたい。

2. 研究の計画

(1) 運動負荷法と糖代謝の関係性についての検討

脳梗塞術後の運動処方の負荷の度合いや様式（強制運動や自発運動、その組み合わせ）を変化させたことによる脳内を中心とした糖代謝産物に与える影響について、生化学的・組織学的に解析する。

(2) 運動負荷法の違いが脳梗塞動物の運動機能の回復に与える影響

糖代謝への影響を基に選んだ運動負荷条件を実験的脳梗塞モデル動物に課し、ビームウォーキング試験や動物用三次元動画撮像装置（Kinematracer, キッセイコムテック社）などを用いて詳細に運動評価する。

(3) 運動負荷法の違いが脳梗塞巣のサイズや神経系細胞の新生に与える影響

運動負荷法の違いと栄養代謝の関係性に加えて、術後の運動処方の違いが脳内の神経機能の再構築にどのような影響を及ぼすのかについて神経組織学的に検討する。まずは生染

色による梗塞巣サイズの違いを定量し比較検討する。また、脳梗塞やその後の運動負荷により惹起された神経系の幹細胞の産生や移動、分化の違いについて調べるために、上記動物群の脳切片を作製し、新生細胞を標識するBrdUと神経発生の細胞種や分化度合いを知ることができる各種マーカー分子の分布と数について定量評価する。

3. 研究の成果

(1) 運動負荷法と糖代謝の関係性についての検討

強制運動の強度がどのようにグルコース代謝の基準となる血中乳酸値に影響を与えるのかについて検討した。具体的にはトレッドミル走による強制運動の運動強度を増大させていく過程で、血液採取直後の乳酸量の生化学的な測定と呼気ガス解析を実施した。その結果、運動強度を増大させるとある変曲点から血中の乳酸値（乳酸性作業閾値）と最大酸素摂取量が著しく上昇することが分かり、齧歯類における糖代謝と運動負荷の関係性が見えてきた。

栄養・運動・分子の関係性を調べるために、各因子が脳内の糖代謝（律速段階や組織（細胞）内外の物質の運搬）に影響を及ぼす分子の発現動態をプロファイリングしている。今年度は、乳酸や酸素欠乏時にエネルギー物質として使用されるケトン体を取り込む輸送体であるMCT2bの脳組織内におけるmRNAの発現量をqPCR法にて調べた。食餌の栄養素（摂取タンパク質）の変化はMCT2bの発現量に影響を与えた。こうした栄養に伴う脳内の代謝変化が、運動負荷に伴う代謝とその後の機能変化にどのような影響を及ぼすのか、新たな研究期間に検証したいと考えている。乳酸以外の定量法については定量法については今後検討の余地があるが、少なくとも糖代謝を定量していく方法については確立しつつある。

(2) 運動負荷法の違いが脳梗塞動物の運動機能の回復に与える影響

脳梗塞術後の動物に対してトレッドミル走による強制運動に加えて、回転車を利用して動物に自発走を促すなど様々な運動負荷を課し、その運動負荷法の違いが運動機能の回復度合いに与える影響について調べた。実験的脳梗塞モデル動物に対して運動強度の異なるトレッドミル走（強制走）トレーニング、回転車を飼育ゲージ内に設置して動物が自発的に走行する事を促すトレーニング、両者を組み合わせたトレーニングを課し、運動機能の回復度合いをビームウォーク試験で定量的に調べた。その結果、障害動物では後肢が角材からスリップする頻度が有意に増加すること、機能回復については、低負荷のトレッドミル走を組み入れる運動法がより効果的である可能性が示唆された。

齧歯類の運動皮質は緻密な運動の調節に関与すると考えられているが、ビームウォーク試験では歩行時にも障害動物の後肢が異常をきたす可能性が示唆された。そこで、運動皮質梗塞はどのように歩行動作に影響を及ぼすのかについて、三次元動画解析装置を用いてラットの歩行を運動学的に解析している。各膝関節の歩行周期あたりの角度変化を調べたところ、脳梗塞モデル動物ではYZ平面上での膝関節の動作に違いが見いだされている。今後、個体数を増やして統計学的に検証していく必要はあるが、各運動負荷による運動機能の回復度合いについては示すことが出来てきた。

(3) 運動負荷法の違いが脳梗塞巣のサイズや神経系細胞の新生に与える影響

術後の運動処方の違いが脳内の神経機能の再構築にどのような影響を及ぼすのかについて、神経組織学的に検討した。脳梗塞やその後の上記複数条件下の運動負荷（トレッドミル走行（低負荷・高負荷）、自発走、両者の組み合わせ）により惹起された神経系の幹細胞の産生や移動、分化の違いについて調べるために、上記動物群の脳切片を作製し、新生細胞を標識するBrdUラベリング実験と神経発生の細胞種や分化度合いを決めるため複数のマーカー（DCX, NeuNなど）の二重免疫染色を実施し、定量評価を行っている。定量法としては梗塞巣近傍、側脳室近傍領域に複数のROI（興味領域）を設定し、それらのROI内のBrdUや二重陽性細胞の数をカウントした。現在までのところ、低負荷トレッドミルを課した動物群でBrdU陽性細胞が多い傾向を示している。

4. 研究の反省・考察

(1) 運動負荷法と糖代謝の関係性についての検討

研究開始当初は、高負荷の運動強度により乳酸量が増え、これが脳の再構築を促すことに関与する可能性を考慮したが、現在までのところ運動処方の違いと運動機能の変化につ

いての関係は、この仮説を支持していない。そこで、特定の代謝産物を生化学的に定量するという計画から、運動処方の程度により異なる糖代謝系を調べるため、より広くプロファイリングする必要性が出てきた。

(2) 運動負荷法の違いが脳梗塞動物の運動機能の回復に与える影響

運動皮質梗塞モデル動物に対して異なる運動負荷を課したところ、少なくとも低負荷トレッドミル走を課することが脳梗塞後の歩行に関する運動障害からの回復を促すことが分かってきた。その運動障害についても障害の度合いや傷害部位を同定していくために、今回三次元動画解析を用いた。市販のシステムに改良を加えることで、脳梗塞術後の運動障害についての詳細が分かってきた。

(3) 運動負荷法の違いが脳梗塞巣のサイズや神経系細胞の新生に与える影響

運動負荷の違いと脳の再構築の関係性について調べたところ、少なくとも運動機能の回復を促進する低負荷トレッドミル走が新たに生まれた神経幹細胞に由来する細胞系譜に影響を与える可能性が見えてきた。今後詳細に系譜解析をする必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Takagi S, Yamashita T, Miura T. Does a Treadmill Running Exercise Contribute to Preventing Deterioration of Bone Mineral Density and Bone Quality of the Femur in KK-Ay Mice, a Type 2 Diabetic Animal Model? *Calcif Tissue Int.* 2017 Dec;101(6):631-640.

(2) 口頭発表

① Kumada, T., Morishita, S., Hokamura, K., Yoshikawa, A., Agata, N., Tsutsui, Y. and Umemura, K. Effects of various exercises on motor recovery through gating and neuro/gliogenesis in motor cortex infarction in rats. The 41st Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington, D.C., USA, 11/11-14, 2017.

② 森下紗帆, 外村和也, 吉川輝, 縣信秀, 梅村和夫, 筒井祥博, 熊田竜郎. Effect of different exercises on the differentiation of neural stem cells and motor recovery in rats with motor cortex infarction. 第95回日本生理学会大会, 高松, 2018.03.30

(3) 出版物

なし

慢性炎症制御を基盤とした 非アルコール性脂肪肝炎治療法の開発 — IVA 型 phospholipase A₂ を標的分子として —

1. 研究の目的

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、肝臓での脂肪蓄積に伴う酸化ストレスや慢性炎症により発症・進展し、その過程で活性化された肝星細胞から産生されたコラーゲンの蓄積により、線維化をきたす進行性の肝疾患である。今回、我々は NASH の進展において重要である慢性炎症を抑制できるような標的分子として IVA 型ホスホリパーゼ A₂ (IVA-PLA₂) に着目し、NASH 治療への応用性について検討する。本酵素は、プロスタグランジン E₂ を含む脂質性生理活性物質の産生過程の初発酵素であり、生体内で炎症反応を制御している重要な酵素であることが示唆されている。これまでに我々は、世界に先駆けて高脂肪食あるいは酸化ストレス誘発性 NASH マウスモデルにおいて、IVA-PLA₂ の欠損や IVA-PLA₂ 阻害剤の経口投与により、病態進展が顕著に抑制されることを見出した。これらの研究成果は、IVA-PLA₂ 阻害剤が NASH の新規治療薬となる可能性を強く示唆している。しかし、NASH 病態の軽減には、高用量の IVA-PLA₂ 阻害剤を全身投与する必要があり、本酵素の生理的機能から考えると副作用の発現リスクが高いと推察される。そこで、より効果的な治療効果や副作用の軽減効果を狙った病態責任細胞選択的な薬物療法の確立に繋げる基礎的知見を得るために、申請者らは細胞種選択的に IVA-PLA₂ 活性を制御するという発想に至った。

NASH の病態進展には、肝実質細胞の細胞死、肝星細胞によるコラーゲン産生およびマクロファージによる炎症の増幅など様々な細胞種が関与している。各細胞種における IVA-PLA₂ の役割は未だ不明であることから、全ての細胞種における IVA-PLA₂ を阻害すると、結果的に治療効果の軽減や副作用の増強が促進される可能性が危惧される。そこで本研究では、細胞種選択的に IVA-PLA₂ 活性を制御することで、より効果的な治療効果や副作用の軽減効果が期待できるという着想の基に、細胞種特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスを用いて、IVA-PLA₂ を介した NASH の進展機構に寄与する責任細胞種の特特定と各細胞種における IVA-PLA₂ の役割を明らかにする

2. 研究の計画

(1) IVA-PLA₂ が介在する NASH の病態進展に寄与する細胞種の特特定

① NASH 検討に最適な Genetic background の決定

各細胞種特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスの作出において、異なる遺伝子背景 (C57BL/6N および C57BL/6J) を持つマウス垂型同士を交配するため、遺伝子背景の混雑による NASH 病態の表現型への影響が懸念された。そこで、交配に使用するマウスの両垂型間での NASH 形成能を比較した。

② 単球・マクロファージ特異的および血管内皮細胞特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスの作製

NASH 病態への関与が予測される肝実質細胞、肝星細胞、マクロファージおよび血管内皮細胞の各細胞特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスを IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスと標的細胞特異的で Cre リコンビナーゼを発現するマウスとの交配により作出した。

③ 各細胞種特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスにおける NASH 病態の解析

各遺伝子改変マウスについて、高脂肪食誘発性 NASH モデルを作成し、肝障害、炎症性細胞の浸潤、脂肪肝形成および肝線維化の程度を解析した。

(2) 細胞培養系での各細胞種における IVA-PLA₂ の役割の解明

IVA-PLA₂ 全身欠損マウスおよび野生型マウスから肝実質細胞や肝星細胞、マクロファージ、血管内皮細胞を単離・培養し、脂肪酸の添加による細胞死誘導、炎症性サイトカインの分泌について解析した。

3. 研究の成果

(1) IVA-PLA₂ が介在する NASH の病態進展に寄与する細胞種の特定

① NASH 検討に最適な Genetic background の決定

細胞種特異的-IVA-PLA₂欠損マウスのNASH解析を行うための遺伝背景を決定することを目的として、C57BL/6J (B6J) とC57BL/6N (B6N) の亜型間でのNASHモデル病態発現解析を行った。四塩化炭素誘発性の肝線維化形成について調べたところ、酸化ストレスマーカーの上昇はB6Nに比し、B6Jマウスにおいて高かったが、肝障害の指標となる血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) およびアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 値の測定や、肝細胞の風船化や炎症性細胞の浸潤に関する組織学的解析においては、BL6NおよびBL6Jマウス間で、有意な差はみられなかった。また、肝組織中のコラーゲンは、BL6Nマウスと比較してBL6Jマウスにおいてより多く蓄積しており、肝星細胞の活性化マーカーである α -SMAの発現量についても、BL6Nマウスと比較してBL6Jマウスにおいて高い傾向を示した。さらに、高脂肪食誘発性のNASH形成能も検討した。高脂肪食投与による体重増加率は、BL6Nマウスと比較してBL6Jマウスの方が低い傾向が見られたが、肝組織中トリグリセリド量は、B6Jの方が高い傾向を示した。また、両亜型間で、コラーゲン蓄積量にほとんど差は認められなかった。このように、亜系統間でNASHの病態の表現型が異なることが示されたため、Creリコンビナーゼ発現マウスおよびIVA-PLA₂^{flox/flox}マウスの遺伝子背景を戻し交配によりBL6N亜型に揃え、各細胞種特異的 IVA型PLA₂欠損マウスを作出した。

② 単球・マクロファージ特異的-および血管内皮細胞特異的-IVA-PLA₂欠損マウスの作製

IVA-PLA₂^{flox/flox}マウスは、既存の常法により作製した全身欠損マウスの標的エクソンと同じP1a2g4a遺伝子のエクソン8をloxPで挟み込んだターゲティングベクターを構築し、組換えES細胞を樹立する常法によって作製した。つまり、ターゲティングベクターをC57BL/6マウスES細胞にエレクトロポレーションにより導入し、PCRおよびサザンブロット法によりloxP配列の挿入を確認できた7つの陽性クローンを単離し、これらを受精卵へインジェクションすることでキメラマウスの作製を行った。この内、1種類のクローンから製したキメラマウスにおいてジャームライントランスミッションが確認され、F1ヘテロマウスとCAG-FLPトランスジェニックマウスとの交配によりネオマイシン耐性遺伝子配列の除去を行った。次いで、遺伝背景をC57BL/6Nとするために4回戻し交配を行い、細胞種特異的Creリコンビナーゼ発現マウスと交配することで各細胞種特異的-IVA-PLA₂欠損マウスを作出した。ポジティブコントロールとして、Cre-loxP systemにより作出された全身性-IVA-PLA₂欠損マウスも作出した。

③ 各細胞種特異的-IVA-PLA₂欠損マウスにおけるNASH病態の解析

NASHを比較的短期間で誘発できるコリン欠乏メチオニン減量高脂肪食 (CDAHFDリサーチダイエツト社, A06071302) あるいは通常食 (ND; MF飼料) を、全身性-、単球・マクロファージ特異的-、あるいは内皮細胞特異的-IVA-PLA₂欠損マウスに3週間与え、肝線維化の程度を比較検証した。肝障害を血清中のASTおよびALT値および肝組織切片のHE染色による組織学的解析により評価し、また脂肪肝の程度については、肝組織におけるトリグリセリド蓄積量の測定およびHE染色による組織観察によって評価した。さらに線維化については、肝組織切片のシリウスレッド染色による肝組織へのコラーゲン線維の蓄積量やWestern blottingによる α -SMA (α -平滑筋アクチン、肝星細胞の活性化マーカー) の発現量の定量によって評価した。全身性欠損マウスと同様の肝障害、脂肪肝形成、および肝線維化進展の抑制が内皮細胞特異的欠損マウスで見られ、単球・マクロファージ細胞特異的欠損マウスでは見られなかったことから、血管内皮細胞のIVA-PLA₂がNASHの発症および病態進展に関与する責任細胞種の一つであることが示された。

(2) 細胞培養系での各細胞種における IVA-PLA₂ の役割の解明

① 肝実質細胞における IVA-PLA₂ の役割

まず、野生型 (WT) マウスおよびIVA-PLA₂欠損マウス由来の初代培養肝実質細胞におけるパラコート (酸化ストレス) 誘発性細胞死に対する感受性を検討したが、酸化ストレス誘発性細胞死はWT細胞とIVA-PLA₂欠損細胞で同等であった。また、パルミチン酸 (PA) 刺激による細胞死に対するIVA-PLA₂阻害剤の影響についても、ヒト肝癌由来細胞

株 (HuH-7) を用いて解析したが、明確な変化は認められず、オレイン酸 (OA) 刺激による炎症性サイトカインの誘導についても IVA-PLA₂ 阻害による変化は認められなかった。一方、通常培養条件下での肝実質細胞の血管内皮細胞増殖因子 (VEGF-A) の発現は、IVA-PLA₂ 阻害剤により有意に抑制された。また、IVA-PLA₂ 欠損マウス由来の肝実質細胞における VEGF-A の mRNA 発現量は、野生型マウス由来肝実質細胞に比し有意に減少していた。

②マクロファージにおける IVA-PLA₂ の役割

WTマウス由来腹腔内マクロファージでは、OA刺激による単球走化性因子 (MCP-1) の発現変動は見られなかったが、PA刺激により MCP-1 の発現量は増加した。しかしながら、PAによる MCP-1 の発現誘導に対する IVA-PLA₂ 阻害剤の影響はほとんど認められなかった。さらに、酸化ストレス誘発物質であるパラコートによる MCP-1 の発現誘導に対する IVA-PLA₂ 阻害剤の影響もほとんど認められなかった。

③肝星細胞における IVA-PLA₂ の役割

通常培養条件下で活性化状態であるヒト由来不死化肝星細胞 (TWNT-1細胞) における MCP-1、 α -SMA、コラーゲンおよび TGF- β 1 (トランスフォーミング増殖因子 β 1) の mRNA 発現量に対する IVA-PLA₂ 阻害剤の影響を解析した。結果、IVA-PLA₂ 阻害剤存在下では、TWNT-1細胞における MCP-1、 α -SMA、コラーゲンおよび TGF- β 1 の発現量が有意に抑制された。さらに、アラキドン酸カスケードの下流に存在するシクロオキシゲナーゼ (COX) およびリポキシゲナーゼ (LOX) のいずれの経路が、肝星細胞の活性化に関与しているかを明らかにするため、これらの mRNA 発現量に対する COX 阻害剤および LOX 阻害剤の影響を解析した。その結果、MCP-1 および肝星細胞の活性化関連遺伝子である α -SMA、コラーゲンおよび TGF- β 1 の発現は COX 阻害剤により抑制されなかったが、LOX 阻害剤存在下では、これらの発現量が、阻害剤濃度依存的に抑制された。

4. 研究の反省・考察

(1) IVA-PLA₂ が介在する NASH の病態進展に寄与する細胞種の特定

①NASH検討に最適な Genetic background の決定

細胞種特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスの作出に使用する、細胞種特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウスおよび IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスの遺伝子背景の亜系統 (BL6N および BL6J) マウスにおける NASH 病態の表現型を比較した。酸化ストレス誘発性 NASH マウスモデルでは、BL6N マウスと比較して BL6J マウスにおいて、酸化ストレスレベルが高く、コラーゲンがより多く蓄積していた。一方、高脂肪食誘発性 NASH モデルでは、BL6N マウスと比較して BL6J マウスにおける体重増加率の低下、肝障害レベルの低下および肝組織中トリグリセリド量の増加が認められた。これらの結果より、Cre リコンビナーゼ発現マウスおよび IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスの遺伝子背景が混雑による NASH 病態の表現型への影響が懸念されるため、本研究で使用する細胞種特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスの作出には、遺伝子背景を BL6N 亜型に揃えた、Cre リコンビナーゼ発現マウスおよび IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスを用いた。

②IVA-PLA₂ が介在する NASH の病態進展に寄与する細胞種の特定

CDAHFD 誘発性 NASH の病態解析の結果、全身性および血管内皮細胞特異的 IVA-PLA₂ 欠損により、肝組織中のトリグリセリドおよびコラーゲン蓄積が抑制され、この現象は単球・マクロファージ特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスでは認められなかった。このことから、血管内皮細胞の IVA-PLA₂ が NASH の発症および病態進展に関与する責任細胞種の一つであることが示された。しかしながら、NASH の病態進展において、血管内皮細胞での IVA-PLA₂ の役割については未だ不明であるため、この解明に向けて、今後、NASH の発症・進行の要因の一つとして考えられている肝臓での血管新生への IVA-PLA₂ の関与に注目し、研究を進めていく。

(2) 細胞培養系での各細胞種における IVA-PLA₂ の役割の解明

肝実質細胞の IVA-PLA₂ は、炎症誘発に関与していないことが示唆されたが、血管新生促進因子である VEGF-A の発現誘導を介した、血管新生の促進作用が示唆された。最近、NASH 病態での血管新生の関与が示唆されていることから、非常に興味深い発見であると期待し

ている。マクロファージのIVA-PLA₂もまた、酸化ストレス誘発性あるいはPA刺激によるMCP-1発現誘導を伴う炎症誘発に関与していないことが示された。このことから、マクロファージから産生されるMCP-1誘発性の白血球浸潤にIVA-PLA₂は関与していないと推察される。また、本実験結果は、単球・マクロファージ特異的欠損マウスにおいて、NASH病態が軽減しなかったという結果とも矛盾がない。肝星細胞の不死化細胞を用いた実験結果ではあるが、今回の検討で肝星細胞のIVA-PLA₂がコラーゲン産生およびMCP-1の発現誘導を亢進すると考えられた。さらに、これらの作用には、IVA-PLA₂の下流に存在するLOXが関与している可能性が考えられた。これらの結果より、肝星細胞のIVA-PLA₂が星細胞自身の活性化促進因子であることが示された。

以上の*in vitro*の実験結果より、肝実質細胞および肝星細胞に発現しているIVA-PLA₂がNASHの病態を進展させる決定的因子である可能性が示唆された。現在、肝実質細胞あるいは肝星細胞特異的IVA-PLA₂欠損マウスの作出を進めており、これらの細胞に発現するIVA-PLA₂のNASH発症・病態進展への関与を明らかにしたい。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

① 秋葉 聡

NASHの新規治療観点としてのIVA型ホスホリパーゼA₂の阻害

日本薬学会第138年会（金沢）、2018. 3.

② 河下映里、石原慶一、柏田千紘、泰地健芳、長尾美奈、加納菜瑠実、米岡那夏子、金井志帆、秋葉 聡

IVA-PLA₂欠損下でのNASH病態軽減に関与する細胞種の特定

2017年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）（神戸）、2017. 12.

③ 中本彩奈、中西李澄、今田百南、河下映里、石原慶一、秋葉 聡

各種肝構成細胞での脂肪酸刺激によるmonocyte chemotactic protein-1

発現誘導へのIVA-PLA₂の関与. 第67回日本薬学会近畿支部総会・大会（神戸）、2017. 10.

④ 今田百南、河下映里、石原慶一、江川奈生、木原望、倉田麻未、種草大貴、秋葉 聡

細胞培養系を用いたNASH病態進展におけるIVA-PLA₂の機能解析

日本薬学会第137年会（仙台）、2017. 3.

⑤ 福本紗与、河下映里、石原慶一、泰地健芳、秋葉 聡

酸化ストレス誘発性肝線維化の進展過程におけるIVA-PLA₂の役割の解明

日本薬学会第137年会（仙台）、2017. 3.

(3) 出版物

なし

水腎症の早期検出を指向した基礎および臨床検討 —水腎症の診断バイオマーカーの開発—

1. 研究の目的

(1) 水腎症患者を対象とした臨床研究

- ①水腎症は慢性化すると不可逆的な腎機能障害につながる。水腎症診断にはCT・エコーや血清クレアチニン値などが用いられるが、これらのみでは正確には評価できないことが多いため、正確な通過障害の評価・鑑別には^{99m}Tc-MAG3利尿レノグラムを組み合わせる。
- ②利尿レノグラムとは、放射性医薬品^{99m}Tc-MAG3を静脈注射すると同時に背面から動態撮像を行い、腎臓の経時的な^{99m}Tc-MAG3の動態情報を示す時間放射能曲線のパターンから、水腎症の診断、尿路通過障害を評価する検査であるが、この検査は高額であるため患者の費用負担が大きく、放射線被曝も避けられないという問題がある。しかしながら、利尿レノグラムに代わる診断法は開発されていない。そこで申請者が見いだした新規腎障害バイオマーカーvanin-1が水腎症の重症度および治療判定に資するか否かを明らかにすることを目的とする。

(2) 水腎症モデル動物を用いた in vivo 研究

- ①vanin-1が水腎症バイオマーカーとなり得るか否かを明らかにする。
- ②水腎症の進展過程におけるvanin-1の役割を解明する

2. 研究の計画

(1) 水腎症患者を対象とした臨床研究

- ①自治医科大学附属さいたま医療センターにおける前向き研究（目標症例数は計70例）として、水腎症患者（Case）および非水腎症患者（Control）に対して、保険診療下にて実施されたCT・エコー・利尿レノグラムに基づく重症度と尿中vanin-1をはじめとする各種バイオマーカーとの比較を行った。
- ②Caseにおいては治療前後の尿中バイオマーカー濃度を比較した。

(2) 水腎症モデル動物を用いた in vivo 研究

- ①水腎症モデル動物（片側尿管結紮ラットを用いて結紮後14日間飼育）を作製し、腎盂尿中および血中vanin-1濃度を評価した。
- ②各ステージにおいて繊維化の指標であるマッソン・トリクローム染色を行うとともに腎切片の免疫染色を行いvanin-1の局在変化を評価した。

3. 研究の成果

(1) 水腎症患者を対象とした臨床研究

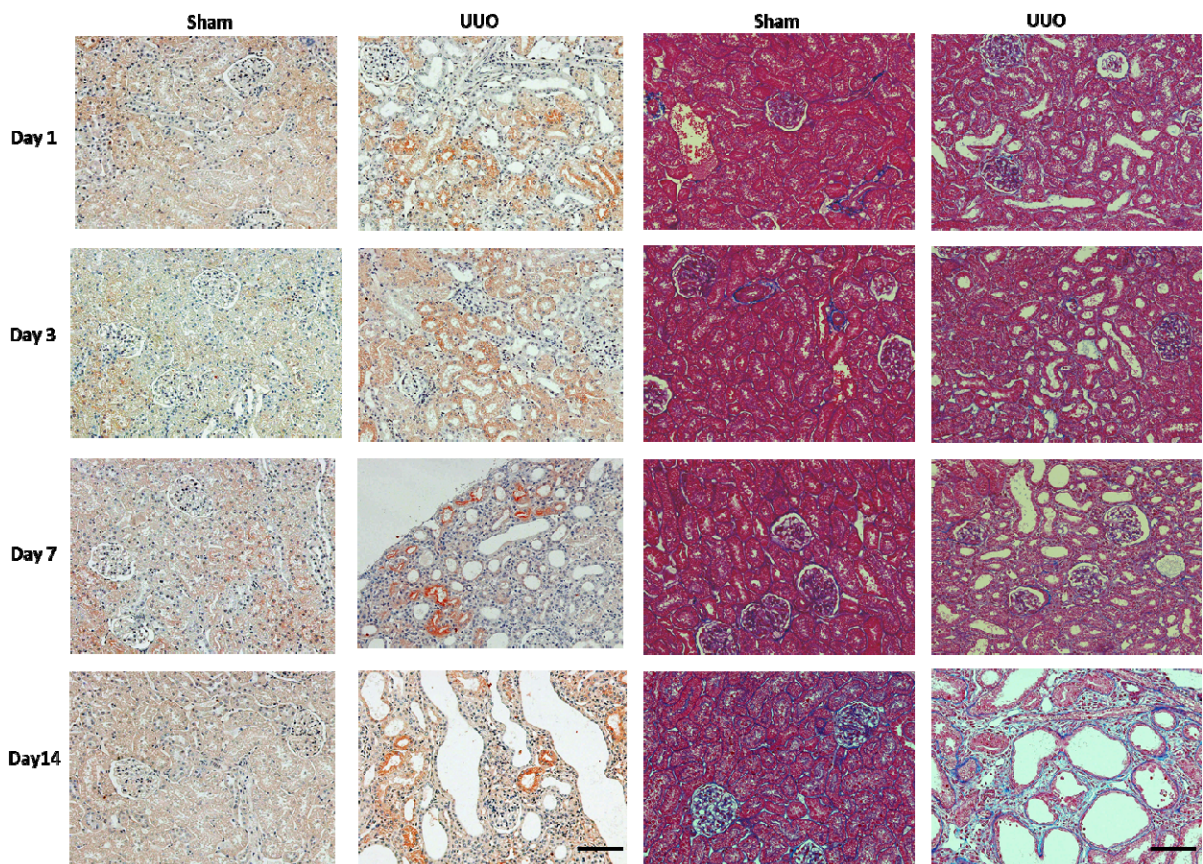
- ①臨床研究の中間解析を平成29年9月1日時点で行った。同意を取得した33例のうち担当医師の判断による脱落例3例を除外すると、解析対象者はControl群11例、Case群19例であった。Caseの内訳は、外科的手術またはステント留置術を行った10例と手術適応がなく経過観察となった9例であった。上記の計20例に対して、尿検体測定および解析を行った。ベースラインにおける膀胱尿中の各種バイオマーカー濃度および腎機能指標（mean ± SD, (95% CI)）を次表に示す（* $P < 0.05$ vs. Control）。Case群におけるvanin-1濃度はControl群に比べて有意に高値であり、upper limitよりも全症例で高値であったことから、水腎症を反映するマーカーであることが示された。

バイオマーカー/腎機能指標	Control(n=11)	Case (n=19)
vanin-1 (ng/mg Cr)	0.093±0.18 (-0.028-0.22)	1.59±2.57(0.35-2.82)*
KIM-1 (ng/mg Cr)	0.423±0.31 (0.211-0.64)	0.68±0.87 (0.25-1.10)
NGAL (ng/mg Cr)	8.895±24.1 (-7.53-24.9)	105.5±199.4 (9.4-201.6)
eGFR (ml/min/1.73 m ²)	63.7± 1.74 (56.2-71.1)	62.1±206 (52.2-72.0)

- ②治療効果判定については、さらなる症例数が必要であり、実施施設を増やすことを検討している。

(2) 水腎症モデル動物を用いた in vivo 研究

- ① 麻酔下に7週齢のSDラットの左尿管を結紮して後天的な水腎症モデル動物 (Unilateral Ureteral Obstruction; UUO) を作製した。1、3、7、14日後に病理変化と尿中vanin-1濃度を評価した。UUO群では腎盂尿、Sham群では膀胱尿を用いた。結紮3日後には尿細管の拡張所見が観察され、7日後、14日後における尿中vanin-1はSham群に比べて有意に高値であった (7日後・UUO : 3.73 ± 1.07 mg/mgCr、7日後・Sham : 0.30 ± 0.12 mg/mgCr、 $P = 0.013$; 14日後・UUO : 3.63 ± 1.47 mg/mgCr、14日後・Sham : 0.07 ± 0.04 mg/mgCr、 $P = 0.028$) 。3日後、7日後の腎組織中のvanin-1タンパクがSham群に比べて有意に低値であったことから、腎盂尿中のvanin-1は水腎症進展過程において尿中へとリリースされたと考えられた。
- ② 繊維化の指標であるマッソン・トリクローム染色を行ったところ、結紮14日後には繊維化が認められた (下右図)。免疫組織染色により、vanin-1は糸球体ではなく尿細管に局在したが、扁平化した尿細管上皮細胞では認められなくなった (下左図)。尿中vanin-1は尿細管上皮細胞に由来するが、繊維化形成とともにタンパクレベルで低下すると考えられた。



4. 研究の反省・考察

(1) 水腎症患者を対象とした臨床研究

- ① 症例の収集に時間がかかった。
- ② 解析可能な症例数を確保するため施設数を増やすなど研究計画の練り込みを早期に検討すべきであった。

(2) 水腎症モデル動物を用いた in vivo 研究

- ① 計画通りに研究が遂行した。
- ② vanin-1は水腎症バイオマーカーであることが明らかになった。水腎症の進展に伴い、繊維化が見られる段階ではvanin-1の発現はみられなくなることから、初期のバイオマーカーであると考えられた。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

- ① **Hosohata K.** Biomarkers for Chronic Kidney Disease Associated with High Salt Intake. *Int J Mol Sci*, 18: E2080. 査読有
- ② Kapse S, Ando H, Fujiwara Y, Suzuki C, Ushijima K, Kitamura H, **Hosohata K**, Kotani K, Shimba S, Fujimura A. Effect of a dosing-time on quetiapine-induced acute hyperglycemia in mice. *J Pharmacol Sci*, 133: 139-145, 2017. 査読有
- ③ **Hosohata K.** Can Focal Segmental Glomerulosclerosis Be Differentiated From Minimal Change Nephrotic Syndrome Using Biomarkers? *Am J Med Sci*, 355: 305-306, 2018. 査読有
- ④ Washino S, **Hosohata K**, Jin D, Takai S, Miyagawa T. Early urinary biomarkers of renal tubular damage by a high-salt intake independent of blood pressure in normotensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 45: 261-268, 2018. 査読有

学 校 名	大 阪 歯 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	安全性の高いiPS細胞由来間葉系幹細胞調達方法の探索		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①iPS細胞 ②間葉系前駆細胞 ③広域顎口腔組織再生 ④再生医療 ⑤幹細胞 ⑥3次元織担体 ⑦歯学			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
馬 場 俊 輔	歯 学 部	教 授	研究代表者・論文作成

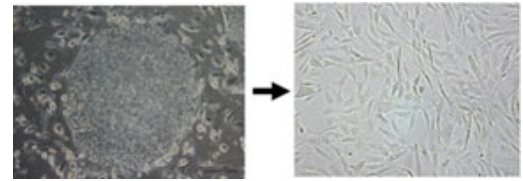
○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
戸 田 伊 紀	歯 学 部	准 教 授	動物実験
橋 本 典 也	歯 学 部	准 教 授	培養実験・論文作成
本 田 義 知	歯 学 部	准 教 授	培養実験・論文作成
南 部 隆 之	歯 学 部	講 師	ゲノム解析実験

安全性の高い iPS 細胞由来間葉系幹細胞調達方法の探索

1. 研究の目的

欠損補綴、顎顔面補綴においてはインプラントによる形態、機能回復が拡大傾向にある。このような状況の中で治療経過を大きく左右する要素として喪失した骨、軟組織をいかにインプラント治療に適した環境に改善するかという点に着目されており、現在の骨補填材に代わり、今後は細胞を用いた再生医療による安全で確実な骨増生が望まれている。再生医療に用いる再生組織をあらかじめ工業的に大量生産して、必要時にいつでも利用可能にするには、培養系を用いた *in vitro* 組織再生が望ましい。山中らは 2007 年ヒトの線維芽細胞にごく少数の遺伝子を導入することによって多能性幹細胞である iPS 細胞を樹立した (Cell, 2007 ; 861-872)。



iPSMSLC への効率的樹立

臨床応用可能な iPSMSLC

iPS 細胞は従来の間葉系幹細胞に比較して無限に増殖する長所を有しており顎顔面補綴のような大きな欠損を治療するには適している。すでにマウス iPS 細胞では、骨分化因子を含む培養液を用い *in vitro* で骨芽細胞へ直接分化させる方法が行われている (STEM CELLS 2011; 206-216, PLoS ONE, 2013 e80026)。

しかし、iPS 細胞から骨芽細胞へ分化させる際に分化が不完全で、未分化な iPS 細胞が混入することで腫瘍が形成されてしまうという臨床的リスクが伴う事、さらに、iPS 継代時にゲノム異常を誘発してしまい分化細胞が癌化するリスクが想定されている。現在、歯科再生医療で行われている細胞治療は骨髄間葉系幹細胞を採取し、骨芽細胞へと分化させ移植するという試みである。我々が樹立を行った iPS 細胞由来の iPSMSLC は、1) 細胞増殖能に限界を持つ骨髄間葉系幹細胞などと異なり、iPS 細胞の特徴である無限に細胞が増殖する利点を受け継ぎ、2) 分化させなくとも癌化しないという間葉系前駆細胞の特徴を有し、3) 血管前駆細胞への分化誘導も報告されており、血管網を含んだ骨組織の迅速再生を実現しうる、等の利点を有す。平成 27 年 9 月より再生医療用 iPS 細胞ストックプロジェクトが立ち上がり、血液から作製された細胞移植において拒絶反応が起こりにくい HLA ホモの iPS 細胞が提供されることとなった。これら細胞の iPSMSLC のストックを作製することで他家移植が可能となり、経済的にも臨床応用への道が開ける。すなわち、iPSMSLC 細胞を用いた顎顔面の再生医療に有用であるに違いない。

2. 研究の計画

(1) iPS 細胞からの iPSMSLC の樹立の効率化

iPS 細胞は mTeSR1 (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada) の培養液を用いてマトリゲル上で (GFRM; BD) フィーダ細胞無しで 3 日間培養を行う。培養液は 10% FBS を含む DMEM low glucose に 10 ng/mL bFGF で 2 週間培養し、継代を行い、ゼラチンコートシャーレに移し、同様の培養液を用い培養を続ける。4 継代で iPSMSLC に形態が変化する。すでに細胞播種密度、培養液組成 (血清品質、bFGF)、細胞外マトリックス (ゼラチン、マトリゲル) が効率化に影響することを明らかにしており、それら条件を変化させることで歯肉 iPS 細胞からの iPSMSLC の樹立効率の最適化を行う。効率化は、フローサイトメトリー解析にて MSC 特異的マーカーである CD44, CD73, CD90, および CD105 の発現率ならびに内皮細胞および造血幹細胞の CD34 および CD45 のマーカー、SSEA-3 および TRA-1-60 のような多能性マーカーが発現していないことから調べる。また、リアルタイム PCR 法によって Lin28 の発現挙動も明らかにする。

(2) iPSMSLC の三胚葉の細胞分化

iPSMSLC を骨細胞、脂肪細胞、軟骨細胞へと分化誘導し、リアルタイム PCR 法による細胞分化遺伝子マーカーの発現、フローサイトメーターならびに特殊染色法によってタンパク質マーカーの発現を調べることで iPSMSLC の三胚葉へ細胞分化する条件を探索する。

(3) iPSMSLC の骨芽細胞分化

iPSMSLC をダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) に 10%FBS、10 ng/mL 線維芽細胞増殖因子を含む培地で培養後、DMEM に 10%FBS と骨芽細胞分化因子 (50 mM アスコルビン酸-2-リン酸、10 mM β -グリセロリン酸、100 nM デキサメタゾン、100 ng/mL BMP-2) を含む培地に交換し、骨芽細胞様細胞への分化誘導を行い、分化誘導後 1、2、3 週で細胞を回収した。骨芽細胞分化因子を添加しない群をコントロール群とした。骨芽細胞様細胞への分化の評価は、Real-time PCR (ALP、Runx2、COL1-A1、OCN)、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性、オステオカルシン (OCN) 発現定量測定により行った。

3. 研究の成果

(1) iPS 細胞からの iPSMSLC の樹立の効率化

iPSMSLC への最適な分化法を探索する為に、我々は、分化方法の最初の工程であるフィーダーフリー化に着目した。フィーダーフリー化する際の培地を、mTeSR1 (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada)、DEF-CSD500 (Takara Bio, Shiga, Japan)、StemFit AK02N (Ajinomoto, Tokyo, Japan)、Stemsure hPS 培地 (Wako, Osaka, Japan) を使用し、培養液は 10% FBS を含む DMEM low glucose に 10 ng/mL bFGF で 2 週間培養し、継代を行い、ゼラチンコートシャーレに移し、同様の培養液を用い培養を続けた。培地により分化スピードの差は認めたが、約 4 継代で iPSMSLC に形態が変化した。

フローサイトメトリー法にて解析を行ったところ、間葉系幹細胞のマーカーである CD24、CD44、CD73、CD90 は陽性を認め、造血幹細胞のマーカーである CD34、CD45 および未分化マーカーである SSEA-4、TRA-1-60 の陰性 (図 1 を参照) を認めた。現在まで、フィーダーフリー化での iPSMSLC への分化には、mTeSR1 が使用されており、近年商品化された他のフィーダーフリー培地 (上記の 3 つ等) における iPS 細胞からの iPSMSLC は報告されておらず、更なる効率化を進行する上で、重要な知見となりうるものが推察される。

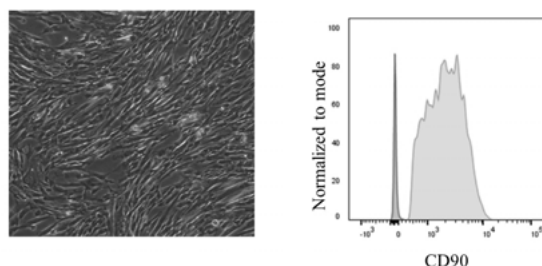


図 1. iPSMSLC と CD90 の発現

(2) iPSMSLC の三胚葉の細胞分化

iPSMSLC を骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞へと分化誘導し、リアルタイム PCR 法による細胞分化遺伝子マーカーの発現を調べた。その結果、Runx2、PPAR γ 、Sox-9 の上昇を認めたためそれぞれの細胞へと分化誘導するのを明らかにした。

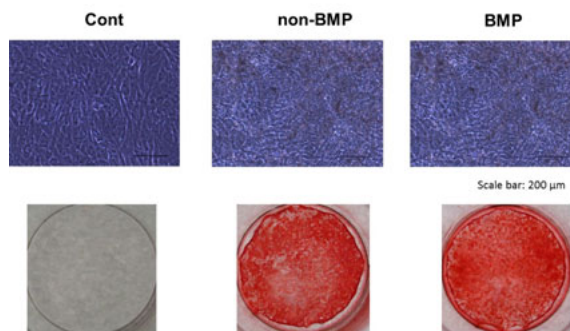


図 2. iPSMSLC 由来骨芽細胞分化のアリザリン染色

(3) iPSMSLC の骨芽細胞分化

iPSMSLC から分化誘導した細胞は Real-time PCR において、コントロール群と比較して、BMP-2 添加群では、ALP は 1、3 週目で、COL1-A1 は 1 週目で最も高かった、Runx2、OCN では上記マーカーと異なる発現挙動を示した。BMP-2 添加群の ALP 活性では 2 週目で最も高い発現を示し、3 週目では発現が低下し、OCN では 3 週目で高い発現を示した。また、アリザリン染色の結果では Bone morphogenetic protein-2 (BMP2) を用いなくても濃染した (図 2)。

4. 研究の反省・考察

作製した MSLC は間葉系幹細胞マーカーを発現し、内皮および造血細胞マーカーは認めなかった。Lin28 の発現がないことから、歯肉 iPS 由来 MSLC は iPS 細胞の残存がなく安全な細胞であると考えられる。Col1A1 と ALP の結果から、BMP-2 は MSLC の骨芽細胞分化の早期の分化を促進するのではないかと考えられる。BMP なし群でも、アリザリン染色の結果からカルシウムの堆積

が確認できたため、分化の終末期に達したと考えられる。またこのカルシウムの堆積は β グリセロリン酸の効果であると推測された。

今後、実用化のためにはゲノム変異性安全性試験が必要である。iPS細胞のゲノム不安定性と造腫瘍性安全性に関する評価を行う。具体的には、iPS細胞を長期、単一培養することであえてゲノム変異を誘発する(Garitaonandia et al, 2015, PLoS ONE) iPS細胞株を作製し、ゲノム変異 iPS細胞由来 MSLC細胞分化誘導する。ゲノム変異 MSLC細胞に iPS が未残存である事を確認後、NOGマウスへ移植することでゲノム異常と造腫瘍性リスクを評価したい (Sci. Reports 2013.)。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Nakayama Y, Hashimoto Y, Honda Y, Matsumoto N Induction of Mesenchymal Stem Cells-like Cells Derived from Human Gingival iPS Cells into Osteoblast-like Cells. Journal of Oral Tissue Engineering. 2017;15(2):85-94.

(2) 口頭発表

- ① 中山 雄司、橋本 典也、本田 義知、松本 尚之. 歯肉 iPS 細胞に由来する間葉系幹細胞様細胞からの骨芽細胞様細胞への誘導. 2017. 12. 9 第 556 回大阪歯科学会例会 枚方市
- ② 上田 衛、橋本 典也、本田 義知、馬場 俊輔、森田 章介. 異なるフィーダーフリー条件における皮膚由来 iPS 細胞からの間葉系幹細胞様細胞の誘導. 2017. 10. 17 第 15 回日本再生歯科医学会総会・学術大会 大阪市

(3) 出版物

なし

ヒト免疫動態解析法の樹立による疾患解析 ーヒト化マウスによる免疫動態解析技術の樹立ー

1. 研究の目的

- (1) 免疫学はマウスを中心とした動物実験や培養細胞による実験系より知見を集積してきたが、医学研究に応用される際には種差に基づく差異が問題となってきた。ヒトを対象とした研究手法は倫理的側面から制限がありヒト特有の免疫現象を解明する手法の確立が待望されてきた。ヒト由来血球系幹細胞/前駆細胞を超免疫不全マウスに移植し生着させる「ヒト化マウス」は、*in vivo* 環境でヒト由来免疫系細胞の分化や動態が観察でき、ヒトの免疫を解明する有力なツールである。我々は、ヒト免疫細胞の抗原応答や免疫寛容の成立と維持およびその破綻における動態調節に着目し、ヒト化マウスの免疫学的解析および2光子顕微鏡を用いた組織イメージング解析系樹立を目標とした。
- (2) これまでの研究計画においてなされたイメージング等の解析からヒト化マウスの胸腺成熟が抗原刺激で促進されること、末梢では成熟 T 細胞の増加と活発な移動が観察された。胸腺ではヒト由来である胸腺細胞と樹状細胞の相互作用が明らかになった。そこで、この過程をさらに掘り下げ、選択過程における HLA 分子の関与や制御性 T 細胞の分化を検討する。
 - ① ヒト胸腺細胞の選択過程が起こる組織構築、細胞相互作用について詳細に検討する。
 - ② ヒト胸腺組織培養を用いて、制御性 T 細胞分化における HLA 分子の必要性を明らかにする。

2. 研究の計画

- (1) 細胞動態、活性化を追跡するための蛍光蛋白質でラベルされたプローブを造血幹細胞に導入し、移植する。
 - ① 文書による同意により無記名で提供されたヒト臍帯血より CD133 陽性細胞を単離し、超免疫不全マウス (NOG もしくは NSG マウス) の骨髄内に注入する。2 カ月後以降、定期的に末梢血を採取し、ヒト由来細胞の生着を確認し、各種免疫細胞の出現状況をフローサイトメトリー法や蛍光免疫組織法にて解析する。
 - ② レンチウイルスベクターを用いて蛍光タンパク感染導入する系を確立する。接着制御分子 Rap1 の活性化型を認識するプローブ (Rap affinity probe), 細胞内カルシウム検出プローブ (GCAMP3), 細胞増殖シグナルを検出するプローブ (NFAT プローブ) をヒト臍帯血由来 CD133 陽性細胞に感染導入し、NOG (NSG) マウスに移植する。導入前にこれらの蛍光プローブを細胞株に導入し、*in vitro* で2光子顕微鏡による定量的イメージングを確認する。移植されるヒト由来血球系幹細胞/前駆細胞に蛍光タンパク質プローブ遺伝子を導入を確認した上で、NOG (NSG) マウスに移植する。NOG (NSG) マウスに移植後、胸腺の発達とヒトリンパ球の分化・成熟を調べ、胸腺内移動と選択との関連を追跡する。そのため、ヒト臍帯血由来造血幹細胞由来細胞のキメラ状態を確認後、胸腺組織を取り出し、組織側のマーカーである BP1, podoplanin の抗体による可視化、および造血幹細胞に導入された GFP マーカーを指標に explant または組織スライス法にてヒト胸腺細胞の移動、樹状細胞の分布を2光子顕微鏡を用いて解析する。
- (2) ヒト化マウス胸腺組織培養を用いて、制御性 T 細胞分化における HLA 分子の必要性を明らかにする。
 - ① ヒト化マウス胸腺組織培養の樹立
 - 1) ヒト化マウスから胸腺を取り出し、組織スライスを作成後、培養する。培養条件として酸素濃度、IL-2 の添加、およびコントロールとして抗ヒト CD3 抗体による刺激を用いる。3日から5日にかけて細胞を取り出し、CD3, CD4, CD8, Foxp3 の発現を調べる
 - 2) 上記実験によって設定された培養条件を用いてイメージング、および抗 HLA 抗体による阻害実験を行い、ヒト胸腺細胞から HLA による選択を受けているかどうかを判定する。

(3) ヒト化マウスを用いた大腸炎症モデルとイメージングの樹立。

①レーザー照射による血管炎症惹起によるイメージング。ヒト化マウスの大腸をイメージング装置に固定し、粘膜固有層の血管損傷から白血球集積過程を可視化する。

3. 研究の成果

(1) CD133 陽性造血幹細胞を骨髄内骨髄移植による直接注入し、ヒト由来細胞生着率7割以上のマウスに OVA ペプチドと CFA を用いて免疫刺激を行った場合、低形成であった胸腺は免疫刺激により増大する現象が再現よく観察された。機能的に髄質に相当するヒト CD4 または CD8 陽性胸腺細胞、ヒト CD11c+SIRPα+の樹状細胞の集積が島状に分布しており、その周りを BP1+, Pdn+のマウス由来胸腺上皮細胞が取り囲むように存在していた。免疫刺激後、髄質相当部位がとくに増大していることが確認できた。

蛍光プローブの細胞内局在を2光子イメージングするため、蛍光蛋白質として Venus を用いた Rap affinity probe、カルシウムセンサーである GCAMP3、NFAT プローブについて *in vitro* の発現系で機能的イメージングを確認した後、レンチウイルス (MOI 100) を用いて臍帯血由来 CD133+造血幹細胞に感染させ、サイトカイン (thrombopoietin, stem cell factor, Flt3 ligand) 存在下で24時間培養後、移植した。2カ月後、簿切した胸腺を高酸素灌流下で2光子顕微鏡を用いて観察した。Venus 陽性細胞の形態から胸腺細胞および樹状細胞が比較的小さな島状に分布しているのが観察された。胸腺は活発に移動し、樹状細胞は定着しながらも突起を活発に伸縮させていた。(1)と同様に免疫した場合、これらの細胞集積が増大し、BP1+Pdn+境界内の髄質と考えられる領域で胸腺細胞はもっとも活発に移動し、樹状細胞と接触している様子が観察された。それに比較し、外側の皮質領域での運動性は低かった。Rap affinity probe は Venus 同様に効率よく発現し、移動過程の胸腺細胞の先端、樹状細胞との接着面に集積した。GCAMP3, NFAT プローブを発現するレンチウイルスを CD133 陽性細胞に感染導入後、NOG (NSG) マウスにくり返し移植したが、高発現するに至らなかった。

(2) 胸腺組織培養について CD3 抗体刺激でヒト胸腺細胞が増殖可能であることを確認したが、CD3 抗体の刺激なしでは IL-2 添加しても増殖は限定的であった。そこで高酸素下で、培養を検討したところ、high oxygen + IL2 添加で胸腺細胞がもっとも増加した。この場合、CD4 または CD8 陽性胸腺細胞、CD4 陽性 Foxp3 陽性の制御性 T 細胞の出現を確認した。今後、HLA 抗体存在下で胸腺細胞の選択過程を追跡する予定である。

(3) 大腸における炎症細胞の動態を可視化するため吸引装置付きレンズを用いて2光子顕微鏡で生体観察を行った。麻酔下でマウスを開腹後、腸管を一部露出し、吸引装置のついた状態で2光子顕微鏡観察下にレーザーを照射後、血管部位への白血球集積を観察できた。炎症性腸疾患のモデルである DSS 腸炎においては抗インテグリン抗体などで免疫細胞移動を阻害し腸炎の治療となるか検証していく。

4. 研究の反省・考察

(1) 本年度の成果として、ヒト胸腺細胞の成熟過程を可視化する方法としてレンチウイルスによる蛍光蛋白質導入により、ヒト胸腺細胞の胸腺内移動や樹状細胞との相互作用を2光子イメージング等を用いて詳細に調べることができ、胸腺細胞選択過程についての解析が可能になった。しかし、いくつかのシグナル可視化プローブは導入が困難であり、他の方法(組織培養によるカルシウムインジケータの使用など)を試みる。

(2) ヒト化胸腺組織培養の条件検討に時間を要したので年度内に胸腺細胞選択過程についての解析ができなかったが、実験系が確立されたので、この過程解析を進める予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①Mouri Y, Ueda Y, Yamano T, Matsumoto M, Tsuneyama K, Kinashi T, Matsumoto M, Mode of Tolerance Induction and Requirement for Aire Are Governed by the Cell Types That Express Self-Antigen and Those That Present Antigen, *J. immunol.*, 2017 199(12):3959-3971

(2) 口頭発表

①Kondo N, Ueda Y, Kinashi T, NDR1 acts as a molecular hub for the organization of

immunological synapse (3-I-W42-12-0/P), The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2017. 12.12-12.14 Sendai.

②Ueda Y, Kondo N, Kamioka Y, Kinashi T, Regulation of cell polarization by Rap1 via NDR/Rab8 axis upon chemokine stimulation(1-G-W13-21-P), The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2017. 12.12-12.14 Sendai.

③Kamioka Y, Ueda Y, Kondo N, Kinashi T, Roles of Rap1 and Kindlin-3 in lymphocyte homing to peripheral lymph nodes (3-I-W42-10-0/P), The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology2017. 12.12-12.14 Sendai.

(3) 出版物

なし

IL-33 がアトピー性角結膜炎などの炎症性疾患に与える影響の研究 —アトピー性角結膜炎に関わる、IL-33 受容体陽性細胞・自然リンパ球の解析—

1. 研究の目的

2型自然リンパ球 (group 2 innate lymphoid cells: ILC2) は、抗原刺激とは関係なくIL-33に直接反応してIL-5やIL-13などの2型サイトカインを産生する、2010年に発見された新しい白血球である。この発見により、Th2細胞が欠損していてもアレルギーが起こるといった謎が解き明かされ、また治療のターゲットとして有力視されていることから、近年、注目されている。ヒトにおいても、アトピー性皮膚炎 (AD) の皮疹部やアレルギー性眼疾患ではILC2の増加が報告されている。

IL-33は自然リンパ球などを抗原なしに活性化 (自然免疫) でき、IL-5やIL-13などのTh2細胞が産生するのと同じアレルギー関連サイトカインを誘導できる点で注目されている。喘息やアレルギー性鼻炎は獲得免疫が主な原因であるのに対して、ADは獲得免疫だけでは説明できず、自然免疫、汗やバリア機能、細菌叢、痒痒などによる多因子疾患であると考えられる。ADはIL-33が表皮で高発現することが分かっている。IL-33が表皮で高発現する遺伝子改変マウスを作成したところ、ILC2の活性化を伴ったAD様の皮膚炎を自然発症し、続いてアトピー性角結膜炎 (Atopic keratoconjunctivitis: AKC) 類似の眼病変も発症した。

AKCは、顔面のアトピー性皮膚炎に合併して生じ、角結膜への好酸球浸潤を伴って角膜障害や視力障害を生じる重篤な難治性の疾患である。AKC患者の結膜の病変部ではIL-33が強く発現していることは分かっていたが、その発症機序はまだよく分かっていない。

本研究では、AKCの発症におけるIL-33の標的細胞やアトピー性皮膚炎の皮膚病変とAKC眼病変の関連性を探索し、AKCの発症におけるIL-33の役割を解明する。また、感染症やドライアイ、自己抗体などとの関連性についても探索する。

- (1) ケラチン 14 プロモーターの制御下に IL-33 を過剰産生する遺伝子改変マウス (hK14-IL-33Tg マウス) において観察される AKC 様眼病変の免疫学的特性を解析する。
- (2) AKC 患者の涙液や結膜に生じる巨大乳頭組織などの臨床検体を用いた免疫学的解析を行う。また、他疾患で採取した検体との比較検討を行う。

2. 研究の計画

- (1) hK14-IL-33Tg マウスにおいて観察される AKC 様眼病変の免疫学的特性の解析
 - ① 経時的に角膜および結膜を採取し、角結膜の変化を検討する。生体染色、サイトカインの免疫染色、ヘマトキシリンエオジン染色、トルイジンブルー染色を行い、角結膜病変の特徴を解析する。また、角結膜に浸潤した炎症細胞をフローサイトメトリーで解析する。
 - ② 角膜、結膜のPCRおよびサイトカイン測定を行い、結膜炎、角膜炎の発症時期の検討および免疫学的特性を解析する。
- (2) AKC 患者の涙液や結膜に生じる巨大乳頭組織などの臨床検体を用いた免疫学的解析
 - ① 同意を得たAKC患者より検体採取を行い、IL-33がAKCにどのように関与するか検討する。
 - ② 感染症やドライアイ、自己抗体などとの関連性についても検討する。

3. 研究の成果

- (1) hK14-IL-33Tg マウスにおいて観察される AKC 様眼病変の免疫学的特性の解析
 - ① hK14-IL-33Tgマウスは20週齢で約半数に、24週齢ではほぼ全例にフルオレセイン染色で確認できる角膜病変を発症した。hK14-IL-33Tgマウスでは免疫染色で角膜上皮細胞核内にIL-33の過剰発現を認めた。ヘマトキシリンエオジン染色では角膜中央部にシールド潰瘍様の角膜潰瘍形成とプラークの付着、角膜上皮の肥厚、角結膜に好酸球を含む炎症細胞浸潤を認め、トルイジンブルー染色では結膜と角膜実質にマスト細胞の浸潤を認めた。フローサイトメトリーでは角膜にILC2が浸潤していることが確認された。
 - ② 角膜病変部のPCRではIL-4、IL-5、IL-13、IL-33遺伝子の高発現を認めた。涙液のプロ

テインアレイではIL-5、13などのTh2サイトカインと、好酸球の活性化、遊走に関与するケモカインの増加を認め、涙液中にもこれらの物質が存在することが確認された。結膜、角膜のリアルタイムPCRでは、IL-4、5、13といったTh2サイトカインのmRNAの発現が上昇していた。また、好酸球のマーカーであるPreg2と好塩基球の特異的分化マーカーであるMmcp8の発現が上昇していた。

ILC2はフローサイトメーターで同定できるが、その表面マーカーはLineage-Sca-1+IL-33受容体 (ST2) +などと表記される。このLineage-という表現は、系統 (Lineage) マーカーがすべて陰性、つまりT細胞、B細胞、NK細胞、NKT細胞、好中球、好酸球、好塩基球などの既知の細胞のマーカーがすべて陰性、という意味で、具体的にはCD3、CD4、CD8、CD19、Gr-1、Siglec-F、NK1.1、IgEといったマーカーがすべて陰性の細胞である。現在、リンパ球であるにもかかわらず、これらLineageマーカーを持たない細胞を自然リンパ球と呼んでいる。角膜病変部の細胞内サイトカイン染色を行い、Lineage陰性でIL-5陽性細胞のみを集めたところ、その97%がST2陽性、Sca-1陽性のILC2であった。

- (2) AKC 患者の涙液や結膜に生じる巨大乳頭組織などの臨床検体を用いた免疫学的解析
検討に必要な検体数を確保することができなかつたため、29年度中に成果をだすことはできなかった。

4. 研究の反省・考察

- (1) hK14-IL-33Tg マウスにおいて観察される AKC 様眼病変の免疫学的特性の解析

hK14-IL-33Tg マウスの角膜病変部では IL-5、13 の主な産生細胞は ILC2 であると考えられた。hK14-IL-33Tg マウスの角結膜病変は、組織学所見やサイトカイン分布がヒト AKC に類似していた。IL-33 と ILC2 は AKC の病態に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、hK14-IL-33Tg マウスは AKC モデルマウスとしても有用である可能性が示唆された。AKC の病態として、さまざまな刺激で眼上皮から遊離される IL-33 が角結膜に常在する ILC2 を活性化し、IL-5、IL-13 などの炎症性サイトカインが産生される結果、AKC が発症するというメカニズムが考えられる。

- (2) AKC 患者の涙液や結膜に生じる巨大乳頭組織などの臨床検体を用いた免疫学的解析
重症 AKC 患者は症例数が少なく、検討に必要な検体数を確保するためには、数年を要すると考えられる。研究成果を臨床につなげるためにも引き続き研究する必要がある。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等

① Imai Y, Hosotani Y, Ishikawa H, Yasuda K, Nagai M, Jitsukawa O, Gomi F, Nakanishi K, Yoshimoto T, Nakamura T, Yamanishi K. Expression of IL-33 in ocular surface epithelium induces atopic keratoconjunctivitis with activation of group 2 innate lymphoid cells in mice. *Sci Rep.* 2017 Aug 30;7(1):10053.

② 今井康友. アトピーに関わる 2 型自然リンパ球 (ILC2) と IL-33, 日皮会誌:128(2), 189-196, 2018.

- (2) 口頭発表

① 細谷 友雅, 今井 康友, 石川 裕人, 中村 隆宏, 安田 好文, 永井 諒, 實川 織江, 中西 憲司, 善本 知広, 山西 清文, 五味 文. アトピー性角結膜炎モデルとしての IL-33 過剰産生遺伝子改変マウスの有用性. 第121回日本眼科学会総会 東京国際フォーラム (東京都, 千代田区) 2017年4月6日~9日 (発表日: 4月6日)

② 今井 康友, 細谷 友雅, 石川 裕人, 安田 好文, 永井 諒, 實川 織江, 五味 文, 中西 憲司, 善本 知広, 中村 隆宏, 山西 清文. 角結膜上皮の過剰な IL-33 はアトピー性角結膜炎を誘導する. 第66回日本アレルギー学会 東京国際フォーラム (東京都, 千代田区) 2017年6月16日~18日 (発表日: 6月16日)

③ Imai Y, Hosotani Y, Kusakabe M, Ishikawa H, Yasuda K, Nagai M, Gomi F, Nakanishi K, Yoshimoto T, Nakamura T, Yamanishi K. Atopic keratoconjunctivitis spontaneously develop in a mouse model of atopic dermatitis expressing the mouse interleukin-33

gene driven by a keratin 14 promoter. Meeting of Society for Investigative Dermatology (SID 2017), Oregon convention center, Portland, USA, April 26-29, 2017

(3) 出版物

なし

ゲノム編集を活用した新たながん治療標的分子の探索・同定 HB-EGF 発現に関与する分子群の解析-

1. 研究の目的

本研究の目的は、造腫瘍能のない卵巣癌、乳癌、胃癌のがん前駆細胞を用いて、種々の遺伝子発現ライブラリーを導入し、HB-EGF の発現亢進にともない造腫瘍能の獲得に寄与する分子群を探索・同定する。HB-EGF は上皮系増殖因子ファミリーに属する細胞増殖因子であり、近年、申請者らはHB-EGF が卵巣癌・乳癌・胃癌などの悪性腫瘍の治療の標的分子であること明らかにしている。これまでの研究成果より、血中HB-EGF 値や組織中HB-EGF 発現量が高い症例が予後不良であり、HB-EGF 特異的阻害剤(BK-UM)投与により血中や組織中のHB-EGF 発現が抑制されることは、申請者らにより明らかにされている。本研究の成果による治療診断検査法の開発とBK-UM 創薬開発を併行して成果をあげることで、臨床的予後の改善と医療費の削減を同時に目指した医療イノベーションを達成でき、さらなる創薬開発が進むことが期待できる。

- ① 代表的な癌抑制遺伝子 p53 および BRCA を欠失させた細胞株を用いて、遺伝子発現ウイルスベクターライブラリーによる癌・増殖に関わる遺伝子を同定する。また、HB-EGF の発現に寄与する遺伝子の同定のため、HB-EGF の 3' UTR 側に IRES 配列に続く GFP 遺伝子配列を挿入し、HB-EGF と GFP の発現が相関する細胞に遺伝子発現ウイルスベクターライブラリーを感染させ、HB-EGF の発現を制御する遺伝子を同定する。
- ② HB-EGF 特異的阻害剤である BK-UM の医師主導型臨床試験において、HB-EGF 値を臨床試験参加の基準のひとつとして参加症例の選別していた。その場合、患者血清を ELISA 法により HB-EGF 値を測定し、高値症例には BK-UM の効果が期待できると期待していた。しかし、ELISA 法による測定では遊離した HB-EGF を測定していない可能性があり、測定方法を見直す必要があった。また、BK-UM 投与症例のなかに、HB-EGF が低いにも関わらず BK-UM の効果があるなどの問題点があった。以上より、HB-EGF 以外または併用でのコンパニオン診断薬の開発が必要であった。

一方で non-coding RNA の一つである micro RNA(miRNA)は近年の研究により、癌の増殖、転移に関与することが多数報告されている。さらに、miRNA はエクソソームに内包されることで、血液中においても安定して存在することが報告された。そこで我々は miRNA に着目して、コンパニオン診断薬の開発を開始した。BK-UM の臨床試験参加症例や卵巣癌患者、正常卵巣患者、良性卵巣腫瘍患者の血液を対象にマイクロアレイ解析を実施し、HB-EGF の発現に関わる miRNA を検索するとともに、BK-UM に感受性を示す患者を選別するためのコンパニオン診断薬を開発する。

2. 研究の計画

- ① HEK293 細胞を用いて、HB-EGF 3' UTR 側に IRES に続く GFP 遺伝子配列を挿入させた細胞を樹立する。樹立したレポーター細胞を用いて、HB-EGF の発現に寄与する遺伝子を shRNA ライブラリーおよび cDNA ライブラリーを併用することで、スクリーニングする。同様の検討をがん細胞株、正常乳腺および正常卵巣上皮より樹立した細胞株を用いて試みる。さらに、3 種類の乳がん細胞株を用いて、二次元培養サンプルとマウスの皮下に移植した xenograft model を作製し、CGH アレイを行う。
- ② 臨床試験の参加症例や卵巣癌、良性卵巣腫瘍患者の血清をマイクロアレイ解析する。検出された miRNA を検討し、BK-UM の効果が期待できる症例を診断する miRNA を同定する。さらに、HB-EGF とともに変動する miRNA を同定し、卵巣癌患者血清を用いて real-time PCR 法で臨床的意義を検証する。

3. 研究の成果

- ① CGH アレイによるスクリーニングやウイルスベクターライブラリーを用いた HB-EGF の制御に関わる遺伝子の探索を行った結果、Y-14 protein(RNA binding motif 8A)を含む 3 つの

遺伝子を同定した。さらに、リポフェクション法による siRNA の導入によって、それらの遺伝子を抑制すると、HB-EGF を含む EGFR ligand の発現が抑制された。なかでも Y-14 が最も抑制された。また、RBM8a を安定し過剰発現または抑制した細胞株をマウスに皮下移植した xenograft model による腫瘍増殖能の検討では、Y-14 の抑制では腫瘍増殖が抑制され、Y-14 の過剰発現では腫瘍増殖が亢進した。卵巣癌患者の血清を対象に、Y14 の発現量を比較検討した結果、Y14 は 6 ヶ月以内に再発した予後不良患者で有意に発現が上昇していた。

- ② 臨床試験で BK-UM に高い感受性を示した患者に特異的な 6 種類の microRNA を同定し、HB-EGF 高発現で予後不良群と HB-EGF 低発現で予後良好群の発現アレイ解析により、HB-EGF が高値で予後不良の症例において有意に発現が上昇する 9 種類の micro RNA を同定した。一方、卵巣癌細胞株に BK-UM を添付して HB-EGF の発現とともに変動する 3 種類の microRNA を同定した。その中の一つである miR-135a-3P は、卵巣癌患者血清でコントロールより有意に高発現であり、特にプラチナ耐性の予後不良患者で高発現であったことを明らかにした。さらに、卵巣癌患者の組織・腹水・血液のいずれにおいても miR-135a-3P の発現が低い場合に予後不良であったことを同定した。

4. 研究の反省・考察

- ① Y-14 はヒトでは、RNA binding motif 8A とよばれ、mRNA のスプライシングや輸送、翻訳や調節に関わるエクソジャンクソン複合体の一つである。MAGOH、PYM などの分子との相互作用により翻訳調節を行うことがわかっている。今回の研究では、Y-14 は HB-EGF の発現を調節することを証明した。さらに、HB-EGF 発現の低下において、転写後発現調節機構が関与しているかを検討するため、RBM8A をノックダウンした細胞により得られた RNA で、HB-EGF の全長を増幅させるような RT-PCR を行った。その結果、RBM8A をノックダウンした細胞で、全長の PCR 産物は減少し、短いフラグメントが増幅され、スプライシング異常が起こっていることが判明した。
- ② miRNA の機能の特性として、一つの miRNA は複数の標的遺伝子を制御している一方で、ひとつの遺伝子を制御するために複数の miRNA が関連すると考えられている。今回の解析で同定された miRNA (miR-135a-3P) は 1 種類であり、さらに解析を進めることでコンパニオン診断薬の候補として数種類の microRNA を同定する必要がある。そのためには、マイクロアレイ解析の結果を再検討し、候補 microRNA を複数検出し、それぞれにおいて RT-PCR 法で臨床的意義を確認する必要がある。

また、卵巣癌患者の組織・腹水・血液のいずれにおいても miR-135a-3P の発現が低い場合に予後不良であったことにより、miR-135a-3P が血清バイオマーカーおよび核酸医薬として有用である可能性が示唆された。今後はこのように同定された miRNA を用いて、卵巣癌細胞株へ遺伝子導入し細胞増殖試験や薬物感受性試験などを行っていく予定である。さらにウイルスベクターを用いて、それらの miRNA を安定的に過剰発現させた細胞株を作製し、その細胞をマウスの皮下に移植して、xenograft model での腫瘍増殖能の検討などを行う。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① MicroRNA-135a-3p as a promising biomarker and nucleic acid therapeutic agent for ovarian cancer.
Fukagawa S, Miyata K, Yotsumoto F, Kiyoshima C, Nam SO, Anan H, Katsuda T, Miyahara D, Murata M, Yagi H, Shirota K, Yasunaga S, Kato K, Miyamoto S:
Cancer Science, 2017 Feb 23. doi: 10.1111/cas.13210.
- ② HB-EGF Is a Promising Therapeutic Target for Lung Cancer with Secondary Mutation of EGFRT790M.
Yotsumoto F, Fukagawa S, Miyata K, Nam SO, Katsuda T, Miyahara D, Odawara T, Manabe S, Isikawa T, Yasunaga S, Miyamoto S:
ANTICANCER RESEARCH, 37: 3825-3831, 2017
- ③ BK-UM in patients with recurrent ovarian cancer or peritoneal cancer: a first-in-human phase-I study.
Miyamoto S, Yotsumoto F, Ueda T, Fukami T, Sanui A, Miyata K, Nam SO, Fukagawa S, Katsuta T,

Maehara M, Kondo H, Miyahara D, Shirota K, Yoshizato T, Kuroki M, Nishikawa H, Saku K, Tsuboi Y, Ishitsuka K, Takamatsu Y, Tamura K, Matsunaga A, Hachisuga T, Nishino S, Odawara T, Maeda K, Manabe S, Ishikawa T, Okuno Y, Ohishi M, Hikita T, Mizushima H, Iwamoto R, Mekada E: BMC Cancer , 17(1), 2017, 89, DOI 10.1186/s12885-017-3071-5, 2017.

④Antitumour Effects of Intravenous Administration of BK-UM, a Novel Inhibitor of HB-EGF, in Ovarian Cancer Therapy.

Fukagawa S, Yotsumoto F, Odawara T, Manabe S, Ishikawa T, Yasunaga S, Miyamoto S: ANTICANCER RESEARCH, 37: 3891-3896, 2017

⑤Serum Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor (HB-EGF) as a Biomarker for Primary Ovarian Cancer.

Miyata K, Yotsumoto F, Fukagawa S, Kiyoshima C, Nam SO, Urushiyama D, Ito T, Katsuda T, Kurakazu M, Araki R, Sanui A, Miyahara D, Murata M, Shirota K, Yagi H, Takono T, Kato K, Yaegashi N, Akazawa K, Kuroki M, Yasunaga S and Miyamoto S: ANTICANCER RESEARCH 37: 3955-3960, 2017

(2) 口頭発表

①「HB-EGF特異的阻害剤(BK-UM)の投与方法による比較」清島 千尋

第69回日本産科婦人科学会学術講演会 平成29年4月13日～16日 広島

(3) 出版物

該当なし

口腔感染症における多臓器間免疫制御ネットワークの解明 — 真菌感染症の新しい予防法と治療法の開発 —

1. 研究の目的

口腔真菌感染症は、カンジダ菌などの口腔内常在菌が原因で発症する難治性の口腔感染症である。その病態には免疫応答が関与しているが、制御機構については未だに解明されていない。高齢化が進む中で、義歯の使用と相まって患者数が増加傾向にある。再発を繰り返す抗真菌薬療法には限界があるために新しい予防法と治療法の開発が待たれているが、真菌に特異的な免疫応答を誘導する治療法の開発は進んでいない。

Candida albicans (*C. albicans*)は、口腔真菌感染症の病原菌として最も頻度が高く、その病原因子や生体防御との関係が特に研究されており、獲得免疫系が疾患と深く関与していることが知られている。なかでもインターロイキン-17 (IL-17) 産生を特徴とするヘルパーT 細胞 Th17 が口腔真菌感染症において重要な役割をはたしており、Th17 細胞欠損マウスでは口腔真菌感染症が重篤化する。真菌そのものがヘルパーT 細胞を分化させる抗原と示唆されているが、T 細胞受容体を介した真菌の抗原性に着目して Th17 細胞の分化や遊走への影響を包括的に解析した報告は認められない。また、これらの Th17 細胞の生体内における主たる分化の「場」が、小腸であることが明らかにされてきたことにより、口腔真菌感染症の研究は口腔から全身を対象とした解析へ移行するパラダイムの転換の必要性が生じてきたと考えられる。

本研究は、病原微生物と宿主免疫応答の両側面からのアプローチによって、研究代表者がこれまで明らかにしてきた免疫系細胞の分化と遊走に焦点をあて、口腔感染症における多臓器間免疫制御ネットワークを解明するとともに、抗原特異的な T 細胞エピトープを同定することで、口腔真菌感染症を選択的にターゲットとする新しい予防法と治療法の開発へ向けた分子基盤を確立することを目的とする。

2. 研究の計画

(1) 分化と遊走を制御している全身における細胞内シグナル経路の同定と機能解析

①前年度に実施した免疫系Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF)発現プロファイルのマイクロアレイの解析を継続して進める。これらの解析結果に基づき、Th17細胞における免疫系GEFの同定を試みる。免疫系GEFの同定された場合には、Pull down assayなどにより新しい免疫系GEFが活性化する低分子量G蛋白質の特定を行い、構造生物学的解析へと橋渡ししていく。

(2) 真菌 T 細胞抗原をもとにした新技術の開発

①前年度までの成果として得られている真菌T細胞抗原の候補分画について、口腔カンジダ真菌感染症による動物実験を用いて病態との関連を検証する。具体的にはIL-17-GFPレポーターマウスから分離したヘルパーT細胞を候補分画抗原と骨髄細胞由来樹状細胞によってTh17細胞へ分化させ、FlowcytometryによってGFPの蛍光発現をシングルセルレベルで確認する。確認されたTh17細胞を野生型マウスに経静脈的に養子移入した後、マウス舌にカンジダ真菌を塗布し口腔カンジダ真菌感染症を発症させ、病態の評価を行うことで候補分画の選別を行う。

②口腔カンジダ真菌感染症の病態評価については、体重変化、舌におけるカンジダ真菌の量、口腔カンジダ真菌感染症の臨床スコア、舌組織の病理学的な炎症細胞浸潤といった項目で評価する。

③病態を制御する分画について、プロテオミクス解析にて候補タンパク質を選定した後、大腸菌を用いて精製タンパク質を作成する。得られた精製タンパク質を用いてIL-17産生を指標に真菌T細胞抗原をタンパク質レベルで同定する。さらにペプチドレベルで抗原が特定された場合には、真菌抗原-MHC複合体テトラマー、真菌T細胞エピトープのペプチドを用いたワクチン開発、真菌抗原特異的T細胞受容体トランスジェニックマウスの作製に着手する。

3. 研究の成果

(1) 分化と遊走を制御している全身における細胞内シグナル経路の同定と機能解析

①前年度に実施した真菌感染マウスから単離したTh17細胞ならびに未感染マウスから単離したナイーブT細胞に関するマイクロアレイのデータについて、免疫系GEF発現プロファイルの解析を継続して進めた。これらの解析結果に基づき、Th17細胞において特徴的な発現を示す免疫系GEFの同定を試みたが、今回の解析結果からは特徴的な免疫系GEFの発現パターンは認められず、Th17細胞特異的免疫系GEFの同定には至らなかった。

(2) 真菌 T 細胞抗原をもとにした新技術の開発

①ヘルパーT細胞の分化能についてIL-17産生を指標として評価し、得られた真菌T細胞抗原の候補分画について解析した。これらの研究成果を、平成29年9月歯科基礎医学会（松本）にて共同研究者とともに2演題「口腔カンジダ症に対してT細胞応答を誘導する抗原探索」「mild heat stress 下の*Candida albicans* バイオフィームと宿主免疫応答の解析」、ならびに平成29年9月日本医真菌学会（金沢）にて2演題「*Candida albicans* に対するT細胞による免疫機構の解明」「Mild heat stress条件下における*Candida albicans* の遺伝子発現と細胞応答」として発表した。さらに、IL-17-GFPレポーターマウスから分離したヘルパーT細胞を候補分画抗原と骨髄細胞由来樹状細胞によってTh17細胞へ分化させ、本年度の本資金で購入したFACSVerse装置を有効に活用して、GEFの蛍光発現をシングルセルレベルで解析した。その後これらの細胞を養子移入して口腔カンジダ真菌感染症の病態評価を行った。

②口腔カンジダ真菌感染症を誘導したマウスについて、体重変化、舌におけるカンジダ真菌の量、口腔カンジダ真菌感染症の臨床スケール、舌組織の病理学的な炎症細胞浸潤といった項目で病態を評価した。これらの評価項目によって、カンジダ真菌の菌糸型細胞膜成分分画によって分化したTh17細胞に口腔カンジダ真菌感染症の発症を抑制する効果があることが明らかとなった。このように個体レベルにおいて口腔カンジダ真菌感染症の発症を抑制する真菌T細胞抗原を特定することに成功した。これらの研究成果は、平成30年3月に英文学術誌にて、Th17 cells differentiated with mycelial membranes of *Candida albicans* prevent oral candidiasis. (*FEMS Yeast Res.* 18(3): foy018, 2018) として公表した。

③特定されたカンジダ真菌の菌糸型細胞膜成分分画について、プロテオミクス解析を行った。解析結果に基づき、前年度の本資金で購入したPCR装置を有効に活用して、候補抗原となった複数の遺伝子を単離した。発現ベクターを構築し、タンパク質抗原を作製した後、真菌反応性T細胞の実験系にてタンパク質レベルで候補タンパク質の免疫応答を検証した。複数のタンパク質においてTh17細胞への誘導能が高いことが示唆された。ペプチドレベルの研究へと展開するために、すでに構築済みの口腔カンジダ真菌感染症による動物実験を用いて病態を確認する状況へと進展した。

4. 研究の反省・考察

口腔真菌感染症は新生児や高齢者、あるいは免疫力が低下した患者におこる難治性の口腔感染症で、その病態には免疫応答が関与している。抗原特異的な T 細胞の解析、特に T 細胞受容体を介して認識する真菌特異的な抗原についての解析は国内外を問わず進んでおらず、Th17 細胞を誘導する T 細胞抗原は未だに明らかになっていない。Th17 細胞そのものは歯周病などでは増悪因子となるため、口腔真菌感染症に対するワクチンの開発において、抗原と無関係に単に Th17 細胞の免疫応答を誘導するだけでは不十分であり、T 細胞受容体を介した真菌特異的な抗原の特定は不可欠であると言える。近年、Th17 細胞を介した免疫応答と真菌感染症の関係が脚光を浴びつつあるものの、その詳細な病態のメカニズムは未だにほとんど明らかにされておらず、口腔真菌感染症に特異的な免疫応答に関する治療法の開発は全く進んでいない。このため、全身での免疫応答の包括的な理解に立脚した口腔真菌感染症に関する基礎的研究が必要であると考えられてきた。

本研究では、*C. albicans* の口腔真菌感染症において Th17 細胞が重要な役割をはたしており、*C. albicans* 菌糸型細胞膜成分分画によって分化した Th17 細胞に口腔カンジダ真菌感染症の発症を抑制する効果があることが明らかとなった(*FEMS Yeast Res.* 18(3): foy018, 2018)。本研究で計画・実施した網羅的なアプローチによる口腔真菌感染症解析の研究報告はこれまでになく、抗体

を主体とする体液性免疫による生体防御機構とは異なるヘルパーT細胞を介した細胞性免疫を主眼とした研究報告ができた意義は高いと考えられる。本研究を継続して発展的に進めることで、菌体成分分画レベルからタンパク質レベルへと精度を上げて抗原を特定できれば、具体的なワクチン開発が視野に入ってくると思われる。ヒトを対象とした研究に発展させるためにも、本研究で実施した生体反応を直接に検証する動物実験の解析による基盤的な研究成果は重要となろう。また、病原性真菌のT細胞抗原をさらにペプチドレベルで同定することができれば、真菌抗原特異的なT細胞受容体トランスジェニックマウスの作製、真菌抗原-MHC複合体テトラマーの開発、そして真菌のT細胞エピトープによる新しいワクチンへの応用が可能となり、本研究成果が将来のより豊かな生活に貢献する医療技術の開発への道を拓くものと期待される。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Tasaki, S., Cho, T., Nagao, J., Ikezaki, S., Narita, Y., Arita-Morioka, K., Yasumatsu, K., Toyoda, K., Kojima, H. and Tanaka, Y. Th17 cells differentiated with mycelial membranes of *Candida albicans* prevent oral candidiasis. **FEMS Yeast Res.** 18(3): foy018, 2018. DOI: 10.1093/femsyr/foy018.

(2) 口頭発表

- ① Tasaki, S., Cho, T., Nagao, J., Narita, Y., Hashimoto, M., Ikezaki, S., Yasumatsu, K., Toyoda, K., Arita-Morioka, K., Kojima, H., Tanaka Y. Investigation of mechanisms underlying the T cell response in oral candidiasis. The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. Sendai, Dec. 12-14th (12th), 2017.
- ② 田崎園子、長 環、永尾潤一、成田由香、橋本麻利江、池崎晶二郎、安松香奈江、有田(森岡)健一、小島寛、田中芳彦. *Candida albicans* に対するT細胞による免疫機構の解明. 第61回日本医真菌学会総会・学術集会, 金沢, 9月30日-10月1日 (30日), 2017.
- ③ 池崎晶二郎、長 環、田崎園子、安松香奈江、成田由香、永尾潤一、有田(森岡)健一、田中芳彦. Mild heat stress条件下における*Candida albicans* の遺伝子発現と細胞応答. 第61回日本医真菌学会総会・学術集会, 金沢, 9月30日-10月1日 (30日), 2017.
- ④ 長 環、池崎晶二郎、田崎園子、安松香奈江、成田由香、有田(森岡)健一、永尾潤一、田中芳彦. mild heat stress 下の*Candida albicans* バイオフィルムと宿主免疫応答の解析. 第59回歯科基礎医学会学術大会・総会, 松本, 9月16-18日 (17日), 2017.
- ⑤ 田崎園子、長 環、永尾潤一、成田由香、橋本麻利江、池崎晶二郎、有田(森岡)健一、安松香奈江、小島寛、田中芳彦. 口腔カンジダ症に対してT細胞応答を誘導する抗原探索. 第59回歯科基礎医学会学術大会・総会, 松本, 9月16-18日 (17日), 2017.

(3) 出版物

なし

環境汚染物質が誘発する酸化ストレス応答の高感度検出法の開発 —高感受性好中球利用による新規影響評価法—

1. 研究の目的

(1) 背景

これまでに申請者らのグループは、越境汚染物質である黄砂 (PM10 の一つ) や PM2.5 の生体影響について動物モデルを解析し報告してきた。PM10 に属する黄砂の影響に関しては、アレルゲン誘導の肺における好酸球増加を増悪させること (Ren Y, Yoshida Y. et al, Allergy Asthma Clin Immunol. 2014;10:30)、またその増悪機構には自然免疫に重要な細胞表面上受容体 TLR2 /TLR4 が関与していること (Song Y, Yoshida Y. et al, Toxicol Res. 2016;5:1445) を報告してきた。更には、肺以外の脾臓において黄砂が転写因子 NF- κ B の活性化を介した亜急性の免疫反応修飾を引き起こし、それは肺の炎症とは時間的に遅延した時点で起こること (Song Y, Yoshida Y. et al, Environ Toxicol. 2015;30:549) を証明した。PM2.5 の影響については、肺の好中球浸潤を引き起こし、アレルギー性疾患の危険因子となり (He M. et al, Inhal Toxicol. 2015;27:287)、またマクロファージにおいて酸化ストレス反応を引き起こすこと (Bekki K, Yoshida Y. et al, Environ Toxicol Pharmacol. 2016;45:362) などを報告してきている。これらの炎症惹起には粒子そのものの性質と、粒子に付着した物質の相互作用の結果であることが分かってきた (He M, Yoshida Y. et al, Sci Rep. 2017;7:11027)。しかしながら、現在まで粒子の大きさ (粒径) の相違、粒子に含まれる構成成分の違いと、生体影響との関連性についての解析は十分には行われていない。更には肺の炎症初期に重要である好中球に焦点を当てた研究も皆無である。本研究課題では、肺での初期炎症を模倣するため、炎症誘導性好中球を調整し、それらに対し異なる粒径の粒子状物質の作用を、細胞内シグナル伝達の観点から解析する課題である。

(2) 研究期間内に明らかにすること (3年計画のうち、初年度に行う計画について)

肺での炎症初期を模倣するため、炎症誘導性マウス好中球を調整し、

- ①粒子状物質に対する *in vitro* での好中球の反応を解析する。
- ②免疫修飾物質の *in vitro* での好中球への影響を解析する。
- ③種々のノックアウトマウスを用いた解析を行う。

2. 研究の計画

(1) 細胞 (好中球) の調製

PM2.5 が肺に入ってきて、炎症を惹起した状態を想定しているため、炎症誘導性好中球を中心に解析を進める。6週齢雌の BALB/c マウス、および各種ノックアウト (KO) マウス (TLR2-KO、TLR4-KO、TLR9-KO、MyD88-KO など) の腹腔内に 4%チオグリコレート 2 ml を注射し、4時間後に HANKs で腹腔内を洗浄して腹腔内洗浄液を採取する。遠心・洗浄して得られた細胞に培養液 RPMI を加えて細胞懸濁液を作成し、フローサイトメトリーによる好中球表面マーカー (CD4/violet, CD11b/cy5.5, Gr1/FITC, F4/80/PE) を解析する。

- ①本研究では炎症誘導性の好中球を想定しているが、他の常在好中球 (脾臓Ly6G・6C陽性細胞、および骨髄Ly6G・6C陽性細胞) との比較も行う。

(2) 食食能の測定

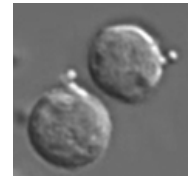
- ①粒子食食能の解析は蛍光顕微鏡 (BZ-X700、キーエンス社) とフローサイトメーターで観察・測定する。

(3) 細胞培養上清・細胞溶解液の調整

好中球を粒子状物質などで刺激し、細胞上清と細胞溶解液を調製する。細胞上清中のサイトカインを ELISA 法で測定、および標的タンパクをウエスタンブロットで解析する。

3. 研究の成果

(1) 好中球の調製は順調に進み、CD11b 陽性細胞率は 90% を超えていた。その貪食能も 60% 以上であることが分かった (下図、好中球が粒子を捉えた瞬間の写真)。さらに、抗酸化剤の存在下ではその貪食能が亢進することから、活性酸素種が好中球の機能を抑制していることがわかった。

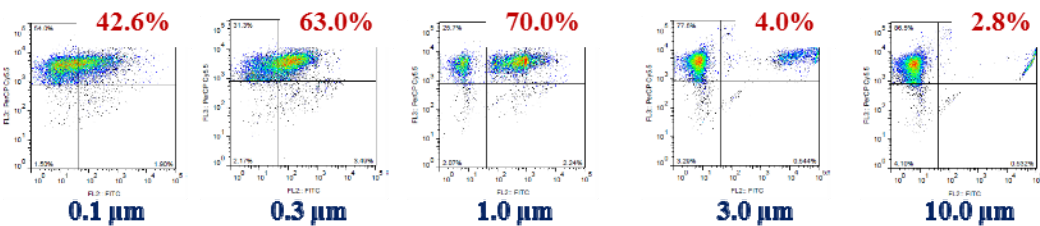


①, ③ 腹腔内炎症誘導性好中球が脾臓・骨髄由来好中球よりも貪食能が高かった。

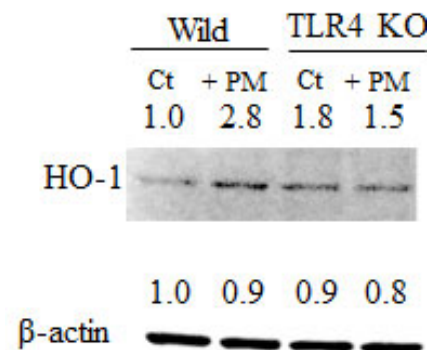
② KOマウスから調整した好中球を用い同様な解析を行った。具体的にはTLR2(グラム陽性菌/マイコプラズマの脂質タンパク、脂質ペプチドを認識する受容体) KOマウス、TLR4(グラム陰性菌の外膜の主成分であるLPSを認識する受容体) KOマウス、MyD88(TLRを介した細胞内シグナル伝達におけるアダプター分子) KOマウスを用いることで、粒子状物質が取り込まれる際に重要な細胞表面受容体のサイトカイン産生や分子活性化における役割を評価した。特にTLR4-MyD88が粒子の貪食に重要な働きをしていることがわかった。

(2) 貪食能の測定

調製した好中球は比較的大きな細胞で、更に細胞内に顆粒を持つ。そのため、フローサイトメトリーで解析すると、大きさと複雑さを反映した領域に分布することが確認され、その集団は多くが貪食細胞のマーカーでもある CD11b が陽性であった。蛍光粒子 (PE) を貪食するとこの集団が右にシフトすることで、貪食能を評価することができる。種々の大きさの粒子を好中球と培養し、3 時間後の様子をフローサイトメトリーで解析した結果が下図である。粒子サイズによって、その貪食能に大きな違いがあることが示唆された。特に 3 μm 以上の粒子の貪食は観察されなかった。これらは PM2.5 の粒径が 1 μm 付近であることを鑑みると、好中球の貪食が生体でも行われていることが予想される結果となった。



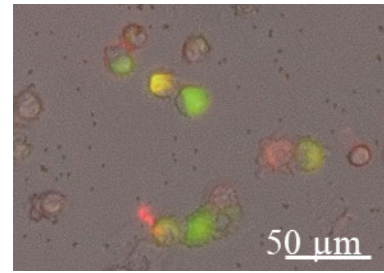
(3) 粒子で刺激した好中球からのサイトカイン産生を炎症性サイトカインである IL-6 と TNF-α の産生能で評価した。予想通り貪食により産生能が亢進していた。また酸化ストレスが何らかの影響を及ぼしていることが示唆されたので、粒子で刺激した好中球の細胞溶解液を用い、酸化ストレスマーカーである HO-1 の発現をウェスタンブロットで調べたところ、発現が増強されていた (右図)。一方、貪食能が低下していた TLR4 KO マウスでは、その発現増強が認められなかった。このことから、貪食の際には自然免疫に重要である TLR4 が鍵となる働きをしていることが示唆された。



4. 研究の反省・考察

環境汚染物質、特に PM2.5 に関しては一過性の肺の炎症は引き起こすものの、全身性には負に生体応答を制御する傾向があり、それは粒子が取り込まれた場所である肺で起こした現象の続きが全身への影響として観察されることを、我々のグループは最近報告している (He C, Yoshida Y. et al, J Appl Toxicol. 2018;38:471)。その鍵を握るのが粒子状環境汚染物質と初期に遭遇する好中球であり、好中球による粒子の貪食が、引き続き起こる生体影響に関連があるのではないかと作業仮説を立てた。まず、in vivo でのシステムで、実際に粒子を気管内投与し、細胞が貪食している様子を肺胞洗浄液中の細胞を使用して観察した。確かに CD11b 陽性細胞が蛍光シリカを貪食している様子が蛍光顕微鏡で観察された (次ページ写真)。今回使用している粒子は付着物質を含んでいないシリカ粒子であるため、LPS や PAH といった物質の手助けなく、貪食が行われたことを示唆する (ただし、生体には補体などは存在するのでその影響は無視できない)。

本研究課題では、肺での初期炎症を模倣するため、まずは好中球の調製方法の検討から行った。肺の炎症が起きた際遊走されてくる好中球に近いフェノタイプということで、チオグリコレート誘発の炎症誘導性好中球に目を付けた。まさに貪食能を備え、炎症サイトカインを産生する細胞であった。異なる粒径の粒子状物質の作用を細胞内シグナル伝達の観点から解析していくのが1つ目の計画であった。驚いたことに、小さい粒子ほど貪食能が高いわけではなく、1 μm の粒径が好中球の‘好み’であった。自然免疫に関与する好中球であるが故に、バクテリアサイズほどを好んで貪食することは非常に興味深かった。



黄色が肺で粒子を取り込んだ好中球を表す

好中球への作用では酸化ストレスが重要な役割を果たしている。貪食後の好中球は確かに酸化ストレスマーカータンパクの発現を増強させていた。抗酸化剤の同時処理により貪食能が亢進したことから、酸性されたROSは貪食をストップするべく、抑制する役割を果たしていた。当研究室では酸化ストレスに高感受性のメタロチオネイン (MT) ノックアウト (KO) マウスを保持し、金属に対する細胞死誘導が非常に高いことを発表している。このマウスの好中球はより鋭敏なストレスマーカーを呈するものと予想され、実際、本年度には期待通りにその貪食能が高いことを観察できている (プレリミナルデータ)。一方、低感受性のマウス (NALP3 -KO マウス) の開発も進めており、既に新技術 (Crisper/Cas9 法) により本年度に F2 を得ることができている。これらのマウスの対比をすることで、よりマーカーの確からしさを強調できるシステムが構築できると考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌など

なし

(2) 口頭発表

① Yasuhiro Yoshida.

Endocytosis and cytokine production by neutrophils is mediated through TLR4 and dynamin proteins and inhibited by ROS production. 2017-12、第40回日本分子生物学会シンポジウム (神戸)

② Wang Duo, Tamotsu Kanazawa, Kentaro Morita, Yasuhiro Yoshida

Dynamin inhibitor interrupts endocytosis of neutrophils. 2017-12、2017年度生命科学系学会合同年次大会 (神戸)

③ Yasuhiro Yoshida, Tadahiro Miyake, Duo Wang, Kentaro Morita.

Endocytosis of particulate matter and cytokine production of neutrophils induced oxidative stress. 2017-09、フォーラム2017: 衛生薬学・環境トキシコロジー (仙台)

(3) 出版物

① Miyake T, Wang D, Matsuoka H, Morita M, Yasuda H, Yatera K, Kanazawa T, Yoshida Y.

Endocytosis of particulate matter induces cytokine production by neutrophil via Toll-like receptor 4. *Int Immunopharmacol.* 2018 Apr;57:190-199. doi: 10.1016/j.intimp.2018.02.020. [Epub 2018 Mar 6.](#)

海洋性珪藻のオイル生産能向上を目指したCO₂固定系解明と増強 —CO₂濃縮強化による光合成機能改変の試み—

1. 研究の目的

珪藻は地球上における一次生産のおよそ20%を担っている。その生産物質は主にオイルであり、有力なバイオ燃料生産藻類候補としても着目される (Yoshida et al. 2012)。珪藻は、光合成で固定した炭素を多糖 (β -グルカン) やオイル (トリアシルグリセロール) として蓄積する。そのため、CO₂固定効率の強化は、多糖やオイルの高蓄積につながることを期待される。

しかし、珪藻生産力の基礎となる光合成分子メカニズムは、極めてユニークな進化を辿り、その殆どは未解明である。珪藻が生育する海水は高塩・高アルカリであるため溶存CO₂濃度は低く (<15 μ M)、一方で高濃度のHCO₃⁻ (2 mM) が存在する。我々の行研究において、海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* が、細胞膜上のHCO₃⁻輸送体 (SLC4) によって積極的にHCO₃⁻を細胞内に取り込み、光合成に利用することを示した (Nakajima et al. 2013, *PNAS*)。SLC4を介したHCO₃⁻利用は、光合成における「CO₂不足」を解消し、海洋性珪藻の生産力を支える重要メカニズムの一つである。これは珪藻CO₂-Concentrating Mechanism (CCM) の重要因子である。

海洋性珪藻の高いオイル生産性を利用するために、CO₂およびHCO₃⁻の取り込みから、葉緑体内での固定に至るまでのプロセスを包括的に理解する必要がある。しかし珪藻では、①取り込まれたHCO₃⁻やCO₂が葉緑体内に輸送されるCCMのしくみ、②葉緑体内でHCO₃⁻がCO₂に変換されてCO₂固定酵素であるRubiscoに供給されるCCMのしくみ、③Rubiscoの活性化メカニズム、④カルビン回路を律速する酵素、などの点が明らかにされていない。また、これらプロセスが環境条件に応じて協調的に調節される機構も不明である。

本研究では、海洋性珪藻の CCM および CO₂ 固定プロセスを包括的に解明し、CO₂ 固定のボトルネックを解放してオイル生産を高めることを目指している。

2. 研究の計画

(1) 珪藻のカルビン回路のボトルネック部位の同定

① 陸上植物のカルビン回路は、sedoheptulose-1,7-phosphatase (SBPase) および fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) が律速因子であり、これらの酵素過剰発現により生産性は約1.5倍となる。珪藻SBPaseは細胞質に局在し、葉緑体には存在しないなど独自の特徴を持つが、カルビン回路律速段階は明らかにされていない。これを明らかにするために、カルビン回路各酵素の過剰発現体を作成する。

② これら過剰発現体を用いて光合成CO₂固定特性およびオイル蓄積量等を調べる。

(2) CO₂ 固定の場である葉緑体内ピレノイドの生化学的構造の解明

① 微細藻類葉緑体内には、ピレノイドと呼ばれるタンパク質ボディが存在する。これはCO₂固定化酵素RubisCOの集積構造体であり、CO₂濃縮と炭酸固定を連結する場と考えられるが、ピレノイド構成因子については多くが謎であり、その構造と機能は不明である。先行研究において珪藻 *P. tricornutum* のピレノイドに、見いだした β 型CAおよびRubisCOと相互作用するタンパク質を精製する。

② これら精製タンパク質をLC-MSによって網羅的に同定し、ピレノイドの生化学的構造とその機能を解明する。

(3) 新規 θ -CA を介した光化学系と CO₂ 固定の協調的制御機構の解明

① 重要な新規ピレノイド因子が発見されたため、本項目を新設する。申請者らが発見した θ -CAはピレノイドを貫通するチラコイドの内腔に局在し、HCO₃⁻のCO₂への変換を加速することでRubisCOにCO₂を供給すると同時にチラコイド膜のpH勾配制御にも関与すると考えられる (Kikutani et al., 2016, *PNAS*)。そこで、 θ -CAと相互作用する光化学系タンパク質の網羅的同定を行う。

② これら因子のノックダウン株での光合成パラメーターの測定を行い、 θ -CAを介した光

合成最適化メカニズムを解明する。

(4) 珪藻が持つ紅藻型 RubisCO の活性化機構の解明

- ① RubisCO は、生体内で複雑な活性制御を受けており、暗下では基質である ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) と強固に結合した不活性状態になる。緑色植物では、RubisCO activase (Rca) が、RuBP を解離させることで RubisCO を再活性化するが、珪藻は、緑色型とは起源が異なる紅藻型 RubisCO を持ち、この活性化酵素は不明である。現在この候補と考えられる CbbX タンパク質を珪藻 *P. tricornutum* のゲノム上に見いだしたため、CbbX が RubisCO の活性化に関与している可能性がある。そこで、珪藻の RubisCO の活性化機構を明らかにするために、組換え CbbX を用いた *in vitro* での RubisCO 活性化実験を行う。
- ② CbbX のノックダウン珪藻株を作出し、光合成特性を野生型と比較して、機能を同定する。

3. 研究の成果

(1) 珪藻のカルビン回路のボトルネック部位の同定

- ① 珪藻カルビン回路の律速段階を探索する目的で、カルビン回路各酵素遺伝子の同定とクローニングを行っている段階である。珪藻ゲノムは2回の共生現象によって複雑にモザイク化しているため、炭酸固定系の還元的ペントースリン酸系を構成する遺伝子群は複数のセットで存在していた。現在これらから葉緑体内に移行することが考えられる因子を特定している。
- ② ①の進展が遅く形質転換体の作製に至っていない。

(2) CO₂ 固定の場である葉緑体内ピレノイドの生化学的構造の解明

- ① 羽状目珪藻 *P. tricornutum* の既知ピレノイド因子、 β -CA および RubisCO と相互作用するタンパク質を、photoアミノ酸というアミノ酸アナログを用いた感光架橋技術を使って単離することに成功した（投稿準備中）。またこの情報をもとに中心目珪藻 *Thalassiosira pseudonana* におけるオーソログ因子を検索し、*P. tricornutum* と同様の葉緑体因子が存在することをつきとめた。
- ② これら単離タンパク質を LC-MS によって網羅的に同定した結果、アセチル CoA カルボキシルラーゼ (ACCase)、複数の機能未知タンパク質が再現性良く検出された。ACCase と機能未知タンパク質は GFP タギングによる解析でピレノイドに局在することが明らかとなった。機能未知タンパク質のひとつはピレノイドの辺縁部を覆う、新規ピレノイド被殻タンパク質で、Pyrenoid Shell 因子 (Pysshell) と命名した。また、ACCase がピレノイドで脂質合成と CCM を直結させていることが示唆された **(国際会議でベストポスター賞を受賞、投稿準備中)**。

(3) 新規 θ -CA を介した光化学系と CO₂ 固定の協調的制御機構の解明

- ① 申請者らが昨年度に発見した、ピレノイド貫通型チラコイドの内腔に局在する θ -CA (Kikutani et al., 2016, *PNAS*) の機能をさらに詳細に解明するために、 θ -CA の相互作用光化学系タンパク質の同定を試みた。因子同定には至っていないが、 θ -CA が CO₂ 環境に応じてチラコイド膜に結合・解離するダイナミズムが観察された (国際会議で発表)。
- ② θ -CA には相同遺伝子が *T. pseudonana* を含めて複数存在していることが判明した。また、この相同遺伝子は珪藻のみならず藻類に幅広く存在することも突き止めた。そのためこれら因子を取得しその局在解析、過剰発現体およびノックダウン体の機能解析を行っている。結果の一部として、これら因子が主にピレノイドに存在すること、一部はミトコンドリア及びオルガネラ間の境界面に存在することが示された (一部データは国際会議で発表)。これら因子のいくつかについて、ノックダウンおよびノックアウト株をすでに取得しており、順次の光合成パラメーターの測定を行いつつある。
- ③ **上記データに基づいて、ピレノイド周辺の新規因子を含めた新たな CCM モデルを提唱した (総説として国際誌に発表: Matsuda et al., 2017; Tsuji et al., 2017b)**

(4) 珪藻が持つ紅藻型 RubisCO の活性化機構の解明

- ① 珪藻が持つ紅藻型炭酸固定化酵素 RubisCO の活性化を担う新規因子 CbbX タンパク質を珪藻 *P. tricornutum* から取得し、リコンビナント CbbX が珪藻 RubisCO の活性化に関与していることを示した (投稿準備中)。
- ② CbbX ノックダウン珪藻株を作出し、光合成特性を野生型と比較したところ、RubisCO 活

性が顕著に低下していると考えられる表現型を示す株が得られた。すなわち、活性化酵素としての機能を同定した（投稿準備中）。

4. 研究の反省・考察

(1) 珪藻のカルビン回路のボトルネック部位の同定

- ① (2), (3)において、CCMにかかわる重要ピレノイド因子の発見が続いたため、ピレノイド構造・機能にかかわる基礎的な知見の精査にプロジェクトのパワーが傾注されたため、(1)は生物情報を精査するにとどまった。
- ② ①の進展が遅く形質転換体の作製に至ることができなかった。

(2) CO₂固定の場である葉緑体内ピレノイドの生化学的構造の解明

- ① photoアミノ酸標識という斬新な手法が機能し、非常に多くの有益な遺伝子と周辺情報が得られた。この技術は1.5Åというほぼファンデルワールス距離による特異的架橋が可能であり、今後難単離タンパク質超複合体の解析にも使用が可能である。
- ② LC-MS解析から判明したピレノイド因子、アセチルCoAカルボキシラーゼ (ACCCase) および Pyrenoid Shell因子 (Pyshell) は非常に有益な情報をもたらしている。まず、ACCCaseがピレノイドで脂質合成とCCMを直結させる機能を有し、脂質合成の始発点となっていることが示唆された。またPyshell因子は二次共生藻で初めての発見であり、地球のCO₂固定の最大45%を担うとされるピレノイド構造・機能解明の第一歩となるであろう。

(3) 新規 θ -CA を介した光化学系と CO₂ 固定の協調的制御機構の解明

- ① 申請者が発見した、 θ -CA (Kikutani et al., 2016, *PNAS*) チラコイド膜に結合・解離することから、チラコイドの光化学系と機能連携することが考えられる。これは光エネルギーと無機炭素平衡がチラコイド内腔で密接な連携関係にあることを示し、これまでATP、NADPH合成およびカルビン回路を隔てて間接的に連携する因子であった光とCO₂が極めて直接的な相互依存関係にあることも示唆しており、今後光合成の基礎知見を一部書き換える可能性もある。
- ② θ -CAは珪藻のみならず藻類葉緑体に幅広く存在することから、水中光合成の収斂進化において重要な鍵因子の一つとして扱われうるものと考えられる。
- ③ これら新規発見因子はここまでのCCMモデルに修正を加えるに十分なインパクトを持つ。また、幅広く存在し藻類ピレノイド機能の収斂進化に、光とCO₂による極めて強い方向性制限が介在することを示している。

(4) 珪藻が持つ紅藻型 RubisCO の活性化機構の解明

- ① RubisCOの活性化因子は今後(1)のサブプロジェクトの一つとして統合する予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等（すべて査読付き原著論文）

- ① Yoshinori Tsuji, Kensuke Nakajima, Yusuke Matsuda (2017年6月) Molecular aspect of biophysical CO₂ concentrating mechanism and its regulation in marine diatoms. *J. Exp. Bot.*, **68(14)**: 3763-3772. doi: 10.1093/jxb/erx173.

(2) 口頭発表

- ① Potential role of adenylyl cyclases as CO₂ sensor in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. Mayu Nakagawa, Kento Saito, Kensuke Nakajima, Yoshinori Tsuji, Yusuke Matsuda, The 73rd Fujihara Seminar, International Conference “Molecular Life of Diatoms” 2017年7月13日 生田神社会館、神戸
- ② Characterization of phosphate uptake mechanism in the marine diatom, *Phaeodactylum tricorutum*. Nanae Kimura, Toshiki Sugiyama, Kensuke Nakajima, Yusuke Matsuda, The 73rd Fujihara Seminar, International Conference “Molecular Life of Diatoms” 2017年7月12日 生田神社会館、神戸
- ③ Aquaporins in two marine diatoms, *Phaeodactylum tricorutum* and *Thalassiosira pseudonana* - the function of plasma membrane type component. Hiroaki Matsui, Brian Hopkinson, Kensuke Nakajima, Yusuke Matsuda, The 73rd Fujihara Seminar, International Conference “Molecular Life of Diatoms” 2017年7月10日 生田神社会館、神戸

- ④海洋性珪藻におけるCO₂応答性機構の解明 中川真佑、斎藤健人、中島健介、松田祐介 日本植物学会第81回大会 2017年9月9日 東京理科大学野田キャンパス
 - ⑤海洋性珪藻における細胞膜重炭酸イオン輸送体 中島健介、岩山和史、大橋弘章、松田祐介 日本植物学会第81回大会 2017年9月9日 東京理科大学野田キャンパス 口頭発表
 - ⑥海洋性珪藻ピレノイドにおける無機炭素流路制御機構の解明 山岸寛征、菊谷早絵、宮武愛、辻敬典、松田祐介 日本植物学会第81回大会 2017年9月9日 東京理科大学野田キャンパス
 - ⑦松田祐介. 海洋一次生産の分子機構:珪藻のCO₂濃縮機構とその制御. 第50回高知大学アカデミアセミナー「バイオマス資源の利活用に向けた化学/生命研究の最前線」. 2018年3月2日. 高知大学 朝倉キャンパス (招待講演)
 - ⑧海洋性珪藻類の無機炭素濃縮機構とθ型炭酸脱水酵素の役割 松田祐介、Hermanus Nawary、辻敬典、中島健介 日本藻類学会第42回大会、2018年3月25日東北大学青葉山新キャンパス
 - ⑨海洋性珪藻*Phaeodactylum tricornutum* ピレノイドにおける無機炭素流路制御とプロトン駆動力制御の解明 山岸寛征、菊谷早絵、宮武愛、辻敬典、松田祐介 日本植物生理学会第59回大会 2018年3月28日 札幌コンベンションセンター
 - ⑩244. 海洋性珪藻におけるcAMP依存的なCO₂応答機構の解明 中川真佑、斎藤健人、中島健介、松田祐介 日本植物生理学会第59回大会 2018年3月28日 札幌コンベンションセンター
- (3) 出版物 なし